

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität Lehrstuhl für  
Stoffwechselbiochemie

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Christian Haass

# Regulierte Intramembranproteolyse des Interleukin-1 Rezeptors II durch $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Sekretase

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Peer-Hendrik Kuhn

aus Mainz

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Haass

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Hans A. Kretzschmar

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Michael Schleicher  
Priv. Doz Dr. Markus J. Schwarz

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Stefan Lichtenthaler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,  
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1. Die Alzheimer Krankheit im Lauf der Geschichte	7
1.2. Die Amyloidkaskade	10
1.3. Amyloid-Vorläufer-Protein APP	10
1.4. Prozessierung von APP durch Sekretasen	13
1.5. Regulierte Intramembranproteolyse	19
1.6. Interleukin-1 Signaltransduktion und die Alzheimer Krankheit	20
1.7. Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit	23
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
2.1. Molekularbiologische Arbeitstechniken	26
2.1.1. Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)	26
2.1.2. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelstücken	29
2.1.3. Subklonierung verschiedener cDNAs in die peak12 Säugerzell-Expressionsvektoren	29
2.1.4. Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien vom Stamm DH5 $\alpha$	32
2.1.5. Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ -Bakterien	32
2.1.6. Präparation von Plasmidvektoren im kleinen Maßstab (Mini-Präp)	33
2.1.7. Sequenzierung von neu klonierten cDNA Konstrukten	33
2.1.8. Präparation von Plasmidvektoren im großen Maßstab	34
2.2. Zellkultur	34
2.2.1. Zelllinien und Kulturmedien	34
2.2.2. Zellkultivierung	35
2.2.3. Transfektion und Selektion stabiler Zelllinien	37
2.2.4. Transduktion von Zellen	38
2.2.5. Behandlung von Zellen mit chemischen Substanzen	40
2.3. Biochemische Arbeitstechniken	40
2.3.1. Analyse sekretierter alkalischer Phosphatase (SEAP) im Zellüberstand	40
2.3.2. Immunfluoreszenz-Mikroskopie	41
2.3.3. Zellyse und Immunpräzipitation	42
2.3.4. Peptidelution von immunpräzipitierten Proteinen	45
2.3.5. Deglykosylierung von peptideluiertem Protein (IL-1R2-Ektodomäne) und anschließende massenspektrometrische Analyse	46
2.3.6. Massenspektrometrische Analyse immunpräzipitierter Peptide mittels Matrix assistierter Laser Desorptions Ionisation (MALDI)	46

2.3.7.	Massenspektrometrische Identifikation von Trypsinpeptiden aus Blaugelbanden mittels Elektrosprayionisation	47
2.3.8.	In-Vitro Verdau von IL-1R2 Juxtamembrandomänen Peptid mit BACE2	48
2.3.9.	$\gamma$ - Sekretase In-Vitro Substratverdau	48
2.3.10.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot	49
2.3.11.	Auftrennen von Proteinen mit kleinem Molekulargewicht	51
2.3.12.	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	52
2.3.13.	Western Blot	52
2.3.14.	Zum Western Blot verwendete Antikörper	53
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
3.1.	IL-1R2 wird durch eine unbekannte Metalloprotease sekretiert	54
3.2.	IL-1R2 kann durch die $\beta$ -Sekretase BACE1 und ihr Homolog BACE2 geschnitten werden	57
3.3.	Westernblot Analyse des Einflusses von BACE1 und 2 auf die	58
3.4.	Der Knockout von BACE1 und BACE2 in primären Maus Neuronen führt zu keiner Verringerung der Gesamtsekretion von IL-1R2, TGF $\alpha$ und CD16	60
3.5.	Selektive Hemmung der $\alpha$ - und $\beta$ -Spaltung von IL-1R2	62
3.6.	Kolokalisierung von HA-IL-1R2-FLAG und BACE1	64
3.7.	Massenspektrometrische Analyse der $\alpha$ - und $\beta$ -Schnittstelle der IL-1R2 Ektodomäne	65
3.8.	BACE-2 in-Vitro Peptidverdau von einem IL-1R2-Juxtamembranpeptid	68
3.9.	IL-1R2 ist ein neues Substrat für den $\gamma$ -Sekretase-Komplex	69
3.9.1.	IL-1R2 CTF akkumuliert unter Behandlung mit DAPT	69
3.9.2.	IL-1R2 sCTF akkumuliert in Presenilin 1/2 defizienten MEFs	71
3.9.3.	Die PS1 Mutante D385N inhibiert die Prozessierung von IL-1R2 sCTF	72
3.9.4.	IL-1R2 CTF koimmunopräzipitiert den $\gamma$ -Sekretase Komplex	73
3.9.5.	$\gamma$ -Sekretase In-vitro-Experiment von CD5-HA-IL-1R2-FLAG	74
3.9.6.	$\gamma$ -Sekretase <i>In-vitro</i> -Experiment mit CD5- $\Delta$ 329-IL-1R2-FLAG	76
3.10.	Massenspektrometrische Analyse der $\gamma$ -Sekretase-Schnittstellen von IL-1R2	77
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>80</b>
4.1.	Die Ektodomänenspaltung von IL-1R2 wird durch eine in der Juxtamembrandomäne schneidende Metalloproteaseaktivität vermittelt	81
4.2.	Proteolytische Prozessierung von IL-1R2 durch BACE1 und 2	83
4.3.	BACE1 und -2 schneiden vier Aminosäuren proximal der $\alpha$ -Schnittstelle	85
4.4.	Das nach der Ektodomänenspaltung von IL-1R2 membran- assoziierte IL-1R2 CTF ist ein neues $\gamma$ -Sekretasesubstrat	87
<b>5.</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>89</b>

<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>90</b>
<b>7. AMINOSÄURECODE</b>	<b>93</b>
<b>8. FIRMENVERZEICHNIS</b>	<b>94</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>95</b>
<b>10. LEBENSLAUF</b>	<b>103</b>
<b>11. SCHRIFTENVERZEICHNIS</b>	<b>104</b>
<b>12. DANKSAGUNG</b>	<b>105</b>
<b>13. PUBLIKATIONEN</b>	<b>106</b>

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

1. Kuhn, P.H., E. Marjaux, A. Imhof, B. De Strooper, C. Haass, and S.F. Lichtenthaler  
**Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase.**  
J Biol Chem 2007 Apr 20, 282(16) p.11982-95

Diese Publikationen sind der vorliegenden Arbeit im Anhang beigelegt.

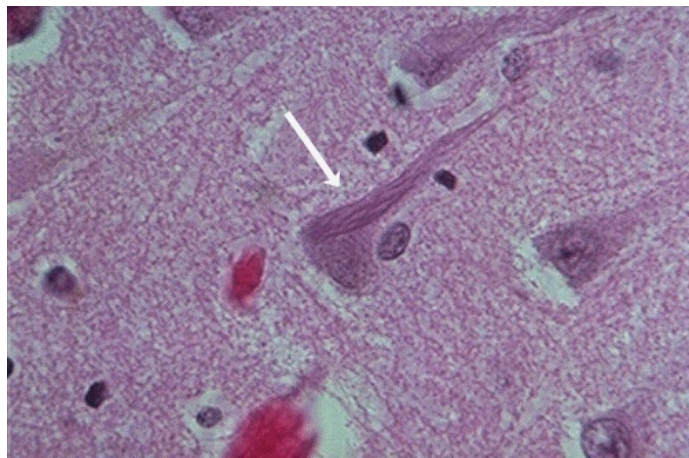
# 1. Einleitung

## 1.1. Die Alzheimer Krankheit im Lauf der Geschichte

Die Alzheimersche Erkrankung (Alzheimer's disease, AD) wurde erstmals 1906 durch den Psychiater und Neurologen Alois Alzheimer beschrieben. Er berichtete, dass die Erkrankung seiner 51 jährigen Patientin Auguste D. anfangs mit Eifersuchtsideen begann. Im weiteren Verlauf beobachtete er eine zunehmende zeitliche und örtliche Desorientierung der Patientin. Darüber hinaus entwickelte sie einen Verfolgungswahn und litt unter emotionaler Instabilität. 1907 stellte er seine Erkenntnisse „über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ auf einem Ärztekongress in Tübingen vor [1]. Die damals neuartige Krankheit ist heutzutage aufgrund der demographischen Entwicklung in der westlichen Welt durch eine zunehmende Überalterung der Gesellschaft Alltag im Leben vieler Hausärzte und Geriater. Mit mehr als 4,5 Millionen betroffenen Menschen in den USA im Jahr 2000 ist die Alzheimersche Demenz heutzutage von allen Demenzformen die Häufigste [2]. In Deutschland ging man im Jahr 2000 von etwa 650000 Alzheimerpatienten aus [3]. Schätzungen zufolge soll sich die Zahl der Alzheimerpatienten bis zum Jahr 2050 aufgrund der angestiegenen Lebenserwartung in den USA auf 13,2 Millionen und in Deutschland auf über 2 Millionen verdreifachen [2, 4].

Die Alzheimersche Krankheit ist klinisch durch eine amnestische Gedächtnisstörung, Verarmung der Sprache und visuokonstruktive Defizite charakterisiert [5]. Im Anfangsstadium der Erkrankung verlieren die Patienten höhere kognitive Fähigkeiten, wie z.B. die Bedienung technischer Geräte. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem progredienten Verlust des Kurzzeitgedächtnisses. Darüber hinaus entwickeln die Patienten eine zunehmende Teilnahmslosigkeit, ein labiles Gefühlsleben und ein eingeschränktes Urteilsvermögen, woraus Aggressivität gegenüber Mitmenschen resultieren kann. In späteren Stadien der Erkrankung machen selbst die einfachen Dinge des Alltags wie Waschen und Kochen bis hin zur eigenen Körperhygiene den Patienten Probleme. Im Endstadium werden die Patienten bettlägerig und versterben oftmals an opportunen Infektionen. Die lange Krankheitsdauer und der frühe Verlust der Selbstständigkeit dieser Patienten stellen hohe pflegerische Anforderungen an die Familien und das Pflegepersonal dieser Patienten.

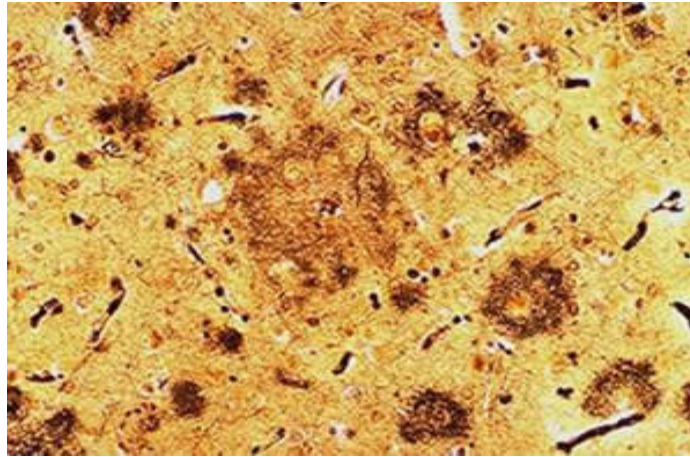
Auf molekularer Ebene lässt sich die Alzheimersche Erkrankung durch zwei charakteristische Merkmale beschreiben, die bislang aber nur post mortem mit eindeutiger Sicherheit festgestellt werden können. Zum einen sind es extrazelluläre, agyrophile, aus dem amyloidogenen Peptid Amyloid- $\beta$  42 ( $A\beta$ -42) bestehende Plaques, welche von aktivierten Mikrogliazellen umgeben sind. Als zweite pathologische Veränderung im Gehirn eines Alzheimer Patienten finden sich neben diesen extrazellulären Plaques die sogenannten intrazellulären TAU Fibrillen (tau tangles), welche aus hyperphosphoryliertem TAU-Protein bestehen und sich zuerst im Hippocampus und enterorhinalen Cortex entwickeln, um in späteren Krankheitsstadien auch im Neocortex aufzutreten. Das zeitlich unterschiedliche Auftreten der TAU Fibrillen in den einzelnen Hirnarealen dient Neuropathologen heutzutage zur Differenzierung der Krankheitsstadien des Morbus Alzheimer [6]. Beide pathologischen Veränderungen wurden schon durch den Neurologen Alois Alzheimer anhand der Obduktion und der mikroskopischen Untersuchung des Gehirns seiner Patientin Auguste D. beschrieben.



**Abbildung 1: Neurofibrilläre Bündel (tangles)** Hier als lange Filamente im Zytoplasma eines Neurons zu erkennen (Pfeil)

(<http://library.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNS094.html>)





**Abbildung 2: Amyloide Plaques** Mehrere Plaques umgeben von degenerierten präsynaptischen Endigungen (Silberfärbung)  
(<http://library.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNS090.html>)

Es sollte aber nochmals weitere 80 Jahre dauern, bis es mit der Sequenzierung des A $\beta$  Peptids [7, 8] erneut zu einem Aufschwung in der Alzheimerforschung mit einer Reihe molekularbiologischer und genetischer Entdeckungen kam. Es stellte sich heraus, dass dominant vererbte Mutationen im Bereich der Gene Presenilin 1 auf Chromosom 14 [9, 10], Presenilin 2 auf Chromosom 1 [11] und dem Amyloiden Vorläuferprotein (Amyloid precursor protein, APP) auf Chromosom 21 [12-18] vor allem in Familien auftraten, deren Mitglieder vor dem 65. Lebensjahr an einer Demenz erkrankten. Man definierte diese Mutationen als FAD (familial Alzheimer's disease) Fälle. Sie machen zwar weniger als 5% aller Alzheimer Demenzen aus, jedoch erkrankten alle Träger aufgrund der 100%igen Penetranz dieser Mutationen. Des Weiteren zeigten sich in den Gehirnen von Trisomie 21 Patienten schon frühzeitig amyloide Plaques, was man sich heutzutage durch die Erhöhung der Gendosis von APP erklärt. Darüber hinaus wurde APOE $\epsilon$ 4 als wichtiger Suszeptibilitätsfaktor bei AD-Fällen, die nach dem 65. Lebensjahr auftreten (sog. late-onset AD), gefunden [19]. Es beschleunigt die Aggregation von A $\beta$  [20] und führt somit wahrscheinlich langsam progredient zur Alzheimer Krankheit. In jüngster Zeit ist ein weiterer genetischer Risikofaktor, der APP sortierende neuronale Rezeptor SorLa, für late-onset AD Fälle vorgeschlagen worden [21]. Aus der geringen Datenlage lassen sich jedoch keine Rückschlüsse ziehen, inwieweit dieser Risikofaktor in der Bevölkerung verbreitet ist.

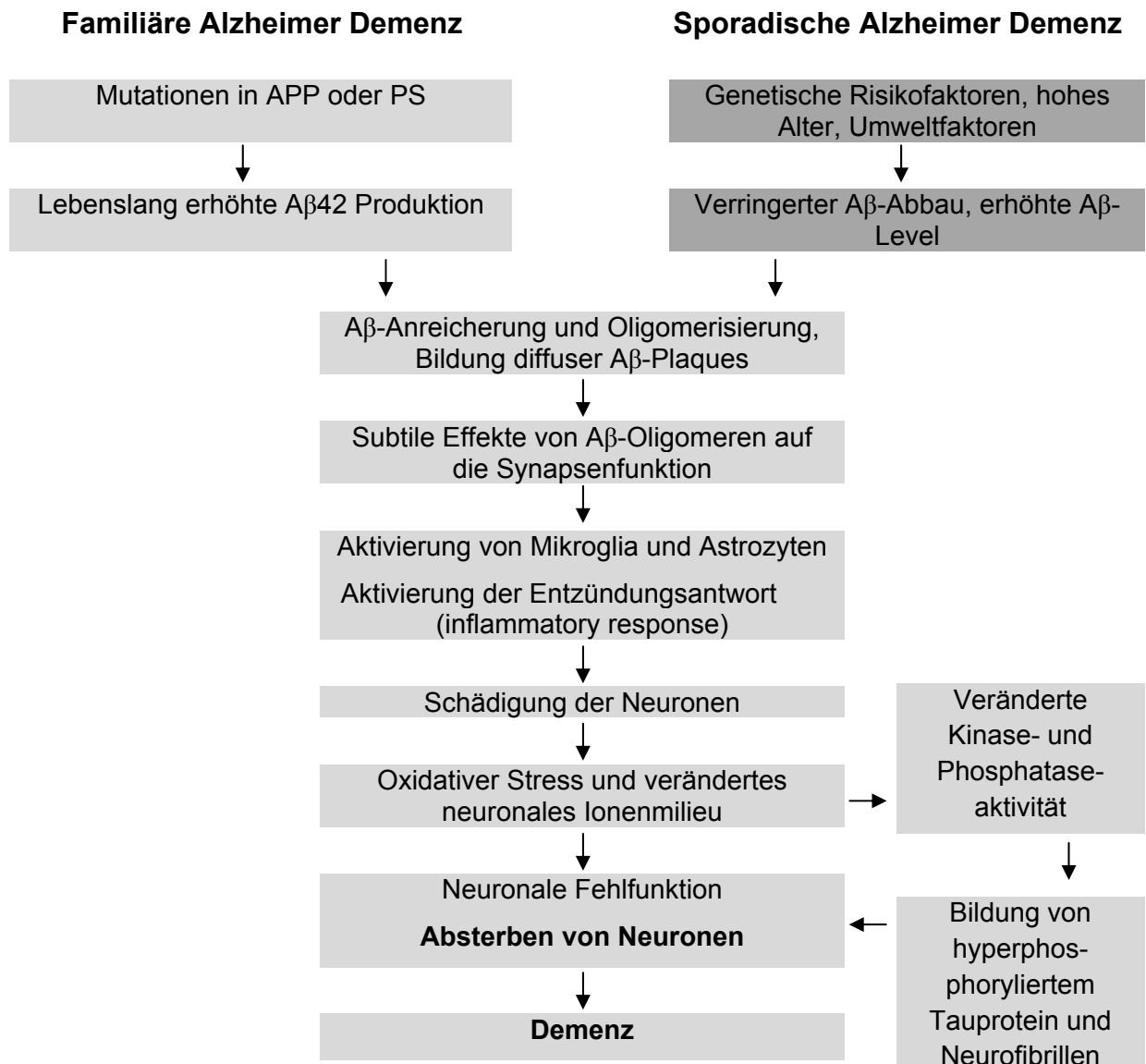
## 1.2. Die Amyloidkaskade

Die Identifizierung von A $\beta$  als Hauptkomponente der amyloiden Plaques zusammen mit der Identifizierung von in die Alzheimer Pathogenese involvierten Genen mündete in die Hypothese der amyloiden Kaskade [22]. Entsprechend dieser Hypothese wird die Akkumulation von A $\beta$  im Gehirn, entweder durch vermehrte Bildung, verzögerten Abbau oder verstärkte Aggregation, als Hauptursache in der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung angesehen. Bei der biochemischen Analyse von A $\beta$  stellte man fest, dass es sich um eine heterogene Mischung unterschiedlich langer Peptide handelt, welche alle aus der proteolytische Prozessierung des Amyloiden Vorläuferproteins hervorgehen. Dabei besteht A $\beta$  vor allem aus der Form A $\beta$ 40 [23] und nur zu einem kleineren Anteil aus der kürzeren Spezies A $\beta$ 38 und der längeren Spezies A $\beta$ 42 [24]. Obwohl sich A $\beta$ 42 von A $\beta$ 40 nur durch die beiden zusätzlichen Aminosäuren Isoleucin und Alanin unterscheidet, neigt vor allem diese Spezies zur Aggregation und kann als Aggregationskeim die Ablagerung von A $\beta$  begünstigen [25, 26]. Tatsächlich konnte *post mortem* im Gehirn von Alzheimerpatienten im Vergleich zu verstorbenen Kontrollpersonen, welche nicht an der Alzheimerdemenz erkrankt waren, vermehrt A $\beta$ 42 nachgewiesen werden, wobei sich das Verhältnis von A $\beta$ 40 zu A $\beta$ 42 verschoben hatte [27].

Mittlerweile geht man davon aus, dass neben den neurotoxischen Protofibrillen [28, 29] auch die oligomeren Zwischenstufen von A $\beta$  durch Störung der synaptischen Übertragung und Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten eine Rolle vor allem in den frühen Stadien der Alzheimer Krankheit spielen [30]. So konnte gezeigt werden, dass kleinere Oligomere von A $\beta$  sowohl *in vivo* bei Ratten als auch in kultivierten Hippocampus-Schnitten einen negativen Effekt auf die Langzeitpotenzierung (Long term potentiation/ LTP) haben, welche ein Maß für die synaptische Plastizität ist [31, 32]. Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass A $\beta$ \*56, ein aus APP-transgenen Mäusen isoliertes Dodecamer von A $\beta$ , nach Injektion in den Hippocampus von lebenden Ratten schon im niedrigen nanomolaren Bereich bei unverändertem Lernverhalten negative Effekte auf das Kurzzeitgedächtnis hat [33].

Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zur Zerstörung von Synapsen und Neuriten. Die daraus resultierende gestörte Ionen-Homöostase führt über eine oxidative Schädigung der Neuronen zu einer veränderten Aktivität von Kinasen und Phosphatasen, welche die Bildung von intrazellulären TAU-Bündeln begünstigen.

Letztendlich führen der Verlust von Neuronen, die neuronale und neuritische Dysfunktion und die dadurch bedingten Transmitterdefizienzen zu den klinischen Symptomen der Demenz.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Amyloidkaskade**

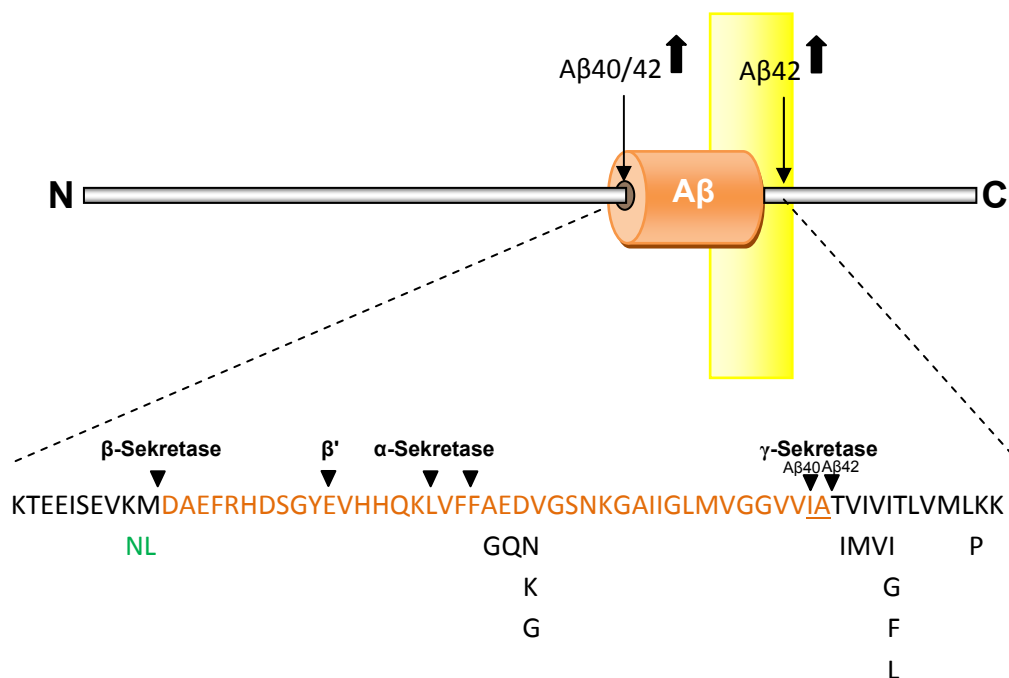
Die Akkumulation von Aβ bei dominant vererbten, familiären Alzheimer wie auch bei sporadischen Alzheimer Fällen wird als primäre Ursache für die Alzheimer Pathogenese gesehen. Vor allem oligomere Zwischenstufen stören die synaptische Übertragung zwischen Neuronen, lösen eine begleitende Entzündungsreaktion und die Aggregation von Tau in Neuronen aus. Am Ende stehen Transmitterverlust und der Untergang von Neuronen. [34]

### 1.3. Amyloid-Vorläufer-Protein - APP

APP ist das Mitglied einer Genfamilie, die darüber hinaus noch die beiden Homologe Amyloid Precursor-like Protein 1 (APLP1) und 2 (APLP2) enthält [35, 36]. APP wird ubiquitär im Körper exprimiert [37]. Durch alternatives Spleißen entstehen jedoch vor allem drei gewebsspezifische Isoformen [38]. Dabei wird die häufigste Form APP751 vor allem in nichtneuronalen Geweben exprimiert, während APP695 in neuronalem Gewebe und APP770 in peripherem glialen Gewebe exprimiert wird [39]. Bei APP handelt es sich um ein Oberflächenprotein, das auf dem Weg vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran zahlreiche posttranslationale Modifikationen erfährt [40]. Dazu gehören die N- und O-Glykosylierung sowie Sulfatierung und Phosphorylierung [41]. Nach Erreichen der Plasmamembran besitzt APP eine kurze Halbwertszeit [40]. Es wird entweder durch  $\alpha$ -Sekretasen oder alternativ nach Endozytose durch die in sauren Endosomen lokalisierte  $\beta$ -Sekretase gespalten [42-46].

Im Zusammenhang mit früh beginnenden, familiären Formen von Alzheimer (FAD) sind für APP eine Reihe von Mutationen beschrieben worden, die präferentiell entweder am N- oder C-terminalen Ende oder innerhalb der A $\beta$  Domäne lokalisiert sind [12, 16-18, 27, 47] (*siehe Abb.4*). Dabei führen Mutationen innerhalb der A $\beta$  Domäne in der Nähe der  $\alpha$ -Sekretaseschnittstelle aufgrund der veränderten Aggregationseigenschaften zu einer Ablagerung von A $\beta$  in den Gefäßen, was zu einer Schwächung der Gefäßwand und damit zu multiplen hämorrhagischen Hirnblutungen führt, welche in der Literatur als zerebrale Amyloidangiopathien (CAA) beschrieben sind [48, 49]. Mutationen am C-terminalen Ende der A $\beta$ -Domäne im Bereich der Transmembrandomäne führen dazu, dass die  $\gamma$ -Sekretase aus C99 präferentiell mehr A $\beta$ 42 bildet, was zu einer beschleunigten Entwicklung von Plaques im Hirnparenchym führt. Die wohl bekannteste aller APP-Mutationen ist eine erstmals in einer schwedischen Familie identifizierte sog. schwedische Doppelmutation, deren Mitglieder frühzeitig im Alter von 30 bis 40 Jahren an der Alzheimerschen Demenz erkranken. Aufgrund des Austauschs von 2 Aminosäuren (K670N/M671L) wird APP zu einem deutlich besseren BACE1 Substrat [50]. Dies führt konsequenterweise zu erheblich mehr toxischem A $\beta$  und damit zu einem früheren Auftreten der Alzheimerschen Demenz.

Obwohl APP eines der am meisten untersuchten Proteine überhaupt ist, ist die physiologische Funktion nach wie vor unklar. Ein Knockout von APP führte bis auf eine verstärkte reaktive Gliose zu keinem ausgeprägten Phänotyp [51, 52]. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass APLP-1 und 2 den Verlust von APP kompensieren können. Hingegen sterben APP/APLP-2 [53] und APLP-1/APLP-2 knockout Mäuse [54] früh postnatal, während APP/APLP-1 knockout Mäuse völlig gesund erscheinen. Der dreifach Knockout von APP, APLP-1 und APLP-2 führt zu einer Störung im Aufbau der einzelnen Neuronenschichten der grauen Substanz wie auch bei der humanen Typ 2 Lissenzephalie [55].

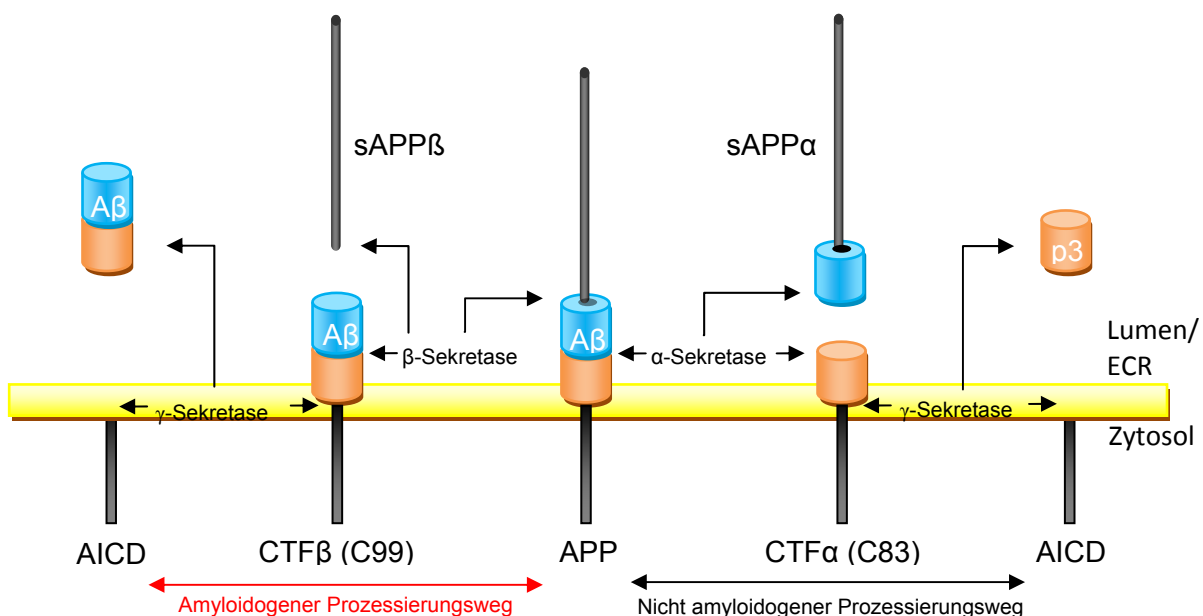


**Abbildung 4: Schematische Darstellung von mit familiärer Alzheimerdemenz (FAD) assoziierten APP Mutationen und deren Effekte auf die Bildung von Aβ (oben).** Lage der Sekretaseschnittstellen (Pfeile) bezogen auf die APP Aminosäuresequenz. Die Sequenz von Aβ ist orange eingefärbt. β' steht für den alternativen β-Sekretase-Schnitt. Darüber hinaus sind einige der FAD Mutationen angegeben, wobei die oben erwähnte

#### 1.4. Prozessierung von APP durch Sekretasen

Die Ektodomäne von APP wird durch α- und β-Sekretase sezerniert. Die amyloide Kaskade (siehe 1.2) beginnt mit der Sekretion der Ektodomäne des Amyloid-Vorläufer-Proteins APP nach proteolytischer Prozessierung durch die β-Sekretase BACE1 (β-site APP cleaving enzyme) (siehe Abb.5). Die Prozessierung von APP

durch BACE1 ist ein normaler Bestandteil des physiologischen Zellmetabolismus [56], macht aber dabei nur etwa 5% der APP-Gesamtsekretion aus. Nach Freisetzung der APP-Ektodomäne wird das in der Membran verbleibende C-terminale Fragment (CTF) C99 anschließend durch eine weitere Protease, den  $\gamma$ -Sekretase Komplex, geschnitten [57]. Dabei wird neben dem amyloidogenen A $\beta$ 42 Peptid und A $\beta$ 38 vor allem die weniger amyloidogene Spezies A $\beta$ 40 in den Extrazellulärraum und die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) in das Zytosol freigesetzt. Der weitaus größere Anteil der APP-Sekretion wird jedoch durch  $\alpha$ -Sekretasen vermittelt (Abb.5). Dabei handelt es sich um Zink-Metalloproteasen aus der ADAM (A disintegrin and metalloprotease) Familie, welche innerhalb der A $\beta$ -Domäne schneiden. Das nach dem  $\alpha$ -Schnitt in der Membran verbleibende, dementsprechend kleinere CTF C83 wird durch die  $\gamma$ -Sekretase zum neurotrophen, sekretierten Peptid p3 und der AICD umgesetzt und beschreibt damit den nicht amyloidogenen Abbau von APP.



**Abbildung 5: Darstellung der proteolytischen Prozessierung von APP.** Nach Prozessierung von APP durch  $\alpha$ -Sekretasen innerhalb der A $\beta$ -Domäne entstehen sAPP $\alpha$  und das C-terminale Fragment C83. Dieses wird nachfolgend durch die  $\gamma$ -Sekretase in das extrazelluläre, neurotrophische Fragment p3 und die APP intrazelluläre Domäne (AICD) prozessiert. Nach Prozessierung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 am N-Terminus der A $\beta$ -Domäne entstehen die lösliche Ektodomäne sAPP $\beta$  und das C-terminale Fragment C99. Dieses wird wiederum nachfolgend durch die  $\gamma$ -Sekretase in das extrazelluläre A $\beta$  und die AICD prozessiert und initiiert damit die Amyloidkaskade.

**$\alpha$ -Sekretase:**

Unter der  $\alpha$ -Sekretase versteht man die proteolytische Aktivität, die in der Lage ist, APP innerhalb der A $\beta$  Domäne zwischen den Aminosäuren Lys 16 und Leu 17 zu schneiden [58, 59]. Es stellte sich heraus, dass es sich bei der  $\alpha$ -Sekretase nicht um eine, sondern um mehrere Proteasen handeln muss. Aufgrund des Inhibitorprofils stellte man fest, dass es sich um Zink-Metalloproteasen aus den Familien der ADAM und MMP handeln muss. Im Augenblick wird angenommen, dass ADAM10, ADAM17 und ADAM9 APP unter physiologischen Bedingungen schneiden können [60-62]. Darüber hinaus existiert ein Homolog der  $\beta$ -Sekretase BACE2, welches im Gegensatz zu BACE1 ohne betonte Expression im Gehirn, ubiquitär im Körper exprimiert wird [63]. Es schneidet im Gegensatz zu BACE1 innerhalb der A $\beta$  Domäne zwischen den Aminosäuren Phenylalanin 690 und Phenylalanin 691 von APP und wirkt somit antiamyloidogen [64].

 **$\beta$ -Sekretase:**

Bei der  $\beta$ -Sekretase BACE1 handelt es sich um eine membranständige, 60 kDa große Aspartylprotease, die vor allem im sauren Milieu der Endosomen bei einem pH-Wert von 4,5 die höchste proteolytische Aktivität aufweist [45]. In diesem Zellkompartiment wird auch APP proteolytisch prozessiert, wodurch die Amyloidkaskade initiiert wird [65]. BACE1 unterscheidet sich von anderen Aspartylprotease dadurch, dass es mittels einer Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert ist. Es wird als Präproprotein im endoplasmatischen Retikulum gebildet, um anschließend an drei von vier möglichen N-Glykosylierungsstellen glykosyliert zu werden [66, 67]. Bei Verlassen des endoplasmatischen Retikulums wird das Propeptid durch eine Furin-ähnliche Endoprotease abgespalten, um danach weiter glykosyliert zu werden [66, 67]. Die zytoplasmatische Domäne und im speziellen das Dileucin-Motiv scheinen für einen normalen Transport von BACE1 nötig zu sein [67]. Mittels einer BACE1 knockout Maus konnte durch die fehlende Bildung von A $\beta$  in diesen Mäusen gezeigt werden, dass es sich bei BACE1 um die lange gesuchte  $\beta$ -Sekretase handelte [68]. Man fand heraus, dass BACE1 beim Menschen ubiquitär und besonders stark im Gehirn

exprimiert ist. Dabei weisen Hippocampus, enterorhinaler Cortex und Cerebellum die höchste Expression auf [45]. Die Expression von BACE1 ist auf transkriptioneller Ebene und auf translationeller durch ihre 5' untranslatierte Region (5'UTR) reguliert [69-72]. Dabei werden die höchsten Expressionslevel während der Embryogenese erreicht, um nach der Geburt innerhalb kurzer Zeit stark herunter reguliert zu werden, was darauf schließen lässt, dass BACE1 wahrscheinlich vor allem in der Embryogenese eine wichtige Rolle spielt [73]. Des Weiteren ist mit dem Golgi-lokalisiertem  $\gamma$ -Ohr-enthaltendem ARF Bindeprotein (GGA3) ein weiteres Protein identifiziert worden, das für die Sortierung von BACE-1 in die Lysosomen verantwortlich ist und damit seinen Abbau beeinflusst [74]. Kommt es im Verlauf der Apoptose zu einer Aktivierung von Caspasen, so wird durch diese unter anderem auch GGA3 geschnitten, wodurch BACE1 stabilisiert wird. Neben GGA3 sind in der Vergangenheit mit GGA1 und 2 weitere GGA-Proteine beschrieben worden, die mit BACE1 interagieren sollen [75, 76]. Nach APP wurden nach und nach auch die beiden APP-Homologe APLP-1 [77] und 2, die Sialyltransferase (ST6GAL1) [78, 79], der P-Selectin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) [80], die  $\beta$ -Untereinheit der spannungsabhängigen Natriumkanäle [81] und Neuregulin-1 [73] als Substrate von BACE1 beschrieben. Vor allem Neuregulin wurde in letzter Zeit aufgrund seiner beschriebenen Funktion in der Myelinisierung peripherer Nerven vermehrte Aufmerksamkeit geschenkt [82, 83]. Es zeigte sich, dass BACE1 knockout Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen bei Geburt eine signifikant verringerte Myelinisierung ihrer peripheren Nerven aufweisen [73]. Gleichzeitig akkumuliert das nicht proteolytisch prozessierte, mature Neuregulin-1 deutlich im Gehirn von BACE1 knockout Mäusen.

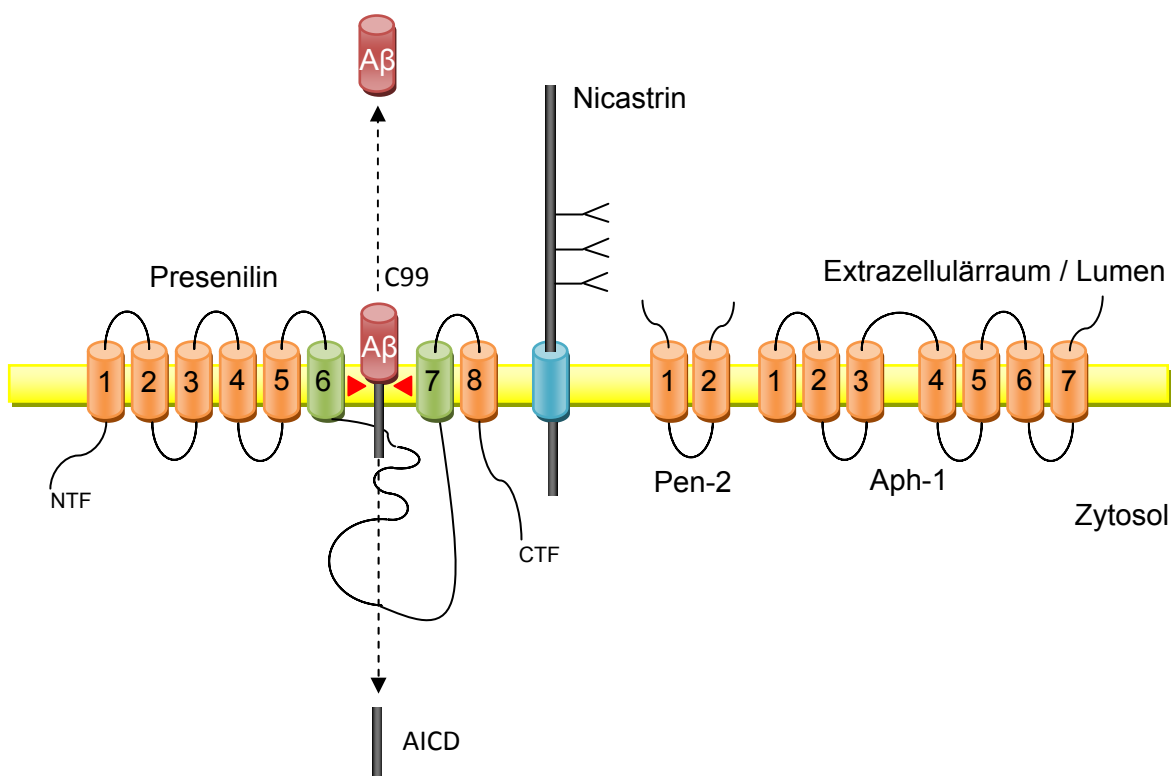
Da es nahe liegt die Bildung von A $\beta$  durch pharmakologische Hemmung von BACE1 zu unterbinden, versuchen viele pharmazeutische Firmen, spezifische Inhibitoren gegen dieses Enzym zu entwickeln. Dies gestaltet sich jedoch aufgrund der breiten und zugleich flachen Substrattasche von BACE1 mehr als schwierig [84]. Darüber hinaus besteht Unklarheit darüber, für welche weiteren physiologischen Prozesse BACE1 im Gehirn neben der postnatalen Myelinisierung der Nerven benötigt wird, so dass eine Hemmung dieses Enzyms einen negativen Einfluss auf die Entwicklung des Gehirns haben könnte.



### $\gamma$ -Sekretase:

Im zweiten Schritt der amyloiden Kaskade schneidet der Aspartylproteasekomplex  $\gamma$ -Sekretase das in der Membran verbliebenen CTF C99. Die Tatsache, dass eine Protease innerhalb der Membran schneiden könnte, war bis vor wenigen Jahren undenkbar, da man sich nicht vorstellen konnte, dass das für die proteolytische Spaltung notwendige Wasser sich innerhalb der hydrophoben Membran aufhalten könnte. Eine Rekonstitution der  $\gamma$ -Sekretase Aktivität in Hefe, welche keine endogene  $\gamma$ -Sekretase exprimiert, konnte zeigen, dass nur die Proteine Presenilin1 (PS1), Nicastrin, Presenilin Enhancer 2 (Pen-2) und Anterior-pharynx defective phenotype-1 (Aph-1) benötigt werden, um einen aktiven  $\gamma$ -Sekretase-Komplex zu erhalten. In letzter Zeit verdichten sich die Hinweise, dass dieser Minimalkomplex aus den Proteinen PS1 bzw. PS2, Nicastrin, Aph-1 und Pen-2 [85] ähnlich einem Ionenkanal innerhalb der Membran eine wassergefüllte Kammer bildet [86]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die GXGD-Aspartylproteasen PS 1 oder 2 mit ihren beiden katalytisch aktiven Aspartylresten in den Transmembrandomänen 6 und 7 das aktive Zentrum des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes bilden. Bereits die Mutation einer der beiden kritischen Aspartate reicht dazu aus, die proteolytische Aktivität dieses Komplexes zu unterbinden [87]. Presenilin 1 und 2 gehören zur Familie der GXGD Proteasen, zu welcher aufgrund des konservierten GXGD Motivs auch die Signal Peptid Peptidase (SPP), die Signal Peptid Peptidase like (SPPI) und die bakterielle Typ4-Prepilin Protease (TFPP) gehören [88, 89]. Mittlerweile sind mehr als 100 Mutationen von Presenilin im Zusammenhang mit der familiären Alzheimerdemenz (FAD) identifiziert worden, welche zu einer vermehrten Bildung von A $\beta$ 42 und damit zu einem verfrühten Auftreten der Erkrankung führen. Presenilin erlangt erst nach der autoproteolytischen Spaltung in ein N- und ein C-terminales Fragment, welche im Komplex miteinander in Verbindung stehen, volle proteolytische Aktivität. Für eine effektive autoproteolytische Spaltung von Presenilin ist die Gegenwart von Pen-2 nötig [90, 91]. Hingegen ist Aph-1 für die Stabilität des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes verantwortlich [92]. 2007 wurde gezeigt, dass Nicastrin als Andockstelle für die Substrate der  $\gamma$ -Sekretase dienen sollte und mittels der Größe seiner Substrattasche die zu schneidenden Proteine nach der Länge ihrer

Extrazellulärdomäne selektiert [93]. Eine vor kurzem erschienene Arbeit konnte diese Daten jedoch widerlegen, so dass Nicastrin zwar immer noch ein essentieller Bestandteil des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes ist, jedoch nicht als spezifische Andockstelle für die Substrate der  $\gamma$ -Sekretase dient [94]. Die vorangehende Ektodomänenspaltung verkürzt jedoch die Extrazellulärdomäne auf die für die Bindung an den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex nötige Länge. Mittlerweile sind zahlreiche  $\gamma$ -Sekretase Substrate in der Literatur beschrieben. In Anlehnung an Notch wurde auch die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) hinsichtlich ihrer Funktion als Transkriptionsfaktor untersucht. Die Daten sind jedoch nicht eindeutig und zum Teil sogar widersprüchlich, so dass der AICD eine Funktion in der nukleären Signaltransduktion nicht eindeutig zugeschrieben werden kann [95, 96]. Darüber hinaus sind eine Reihe weiterer  $\gamma$ -Sekretase Substrate wie z.B. CD44, ErbB-4 Rezeptor, IL-1R2, Delta und Jagged bekannt [97-101].

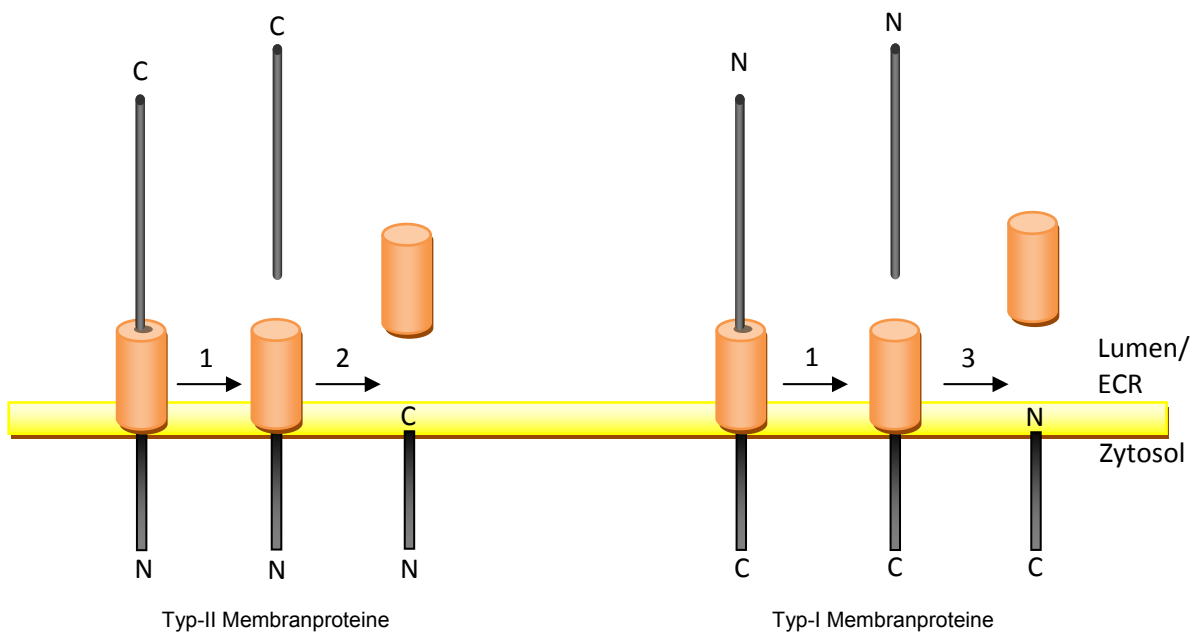


**Abbildung 6: Schematische Darstellung der einzelnen Komponenten des  $\gamma$ -Sekretasekomplexes.** Die Transmembrandomänen 6 und 7 von Presenilin, welche die für die katalytische Aktivität wichtigen Aspartatreste tragen sind grün eingefärbt. Dargestellt sind die Prozessierung des aus dem BACE-1 Schnitt von APP resultierenden C99 CTF und seine Umsetzung in A $\beta$  und die AICD.

### 1.5. Regulierte Intramembranproteolyse

Die beschriebene sequentielle Prozessierung von Typ I und Typ II Membranproteinen in der Ektodomäne und die darauffolgende Prozessierung des membranständigen Fragments in der Membran wird auch als regulierte Intramembranproteolyse bezeichnet. Neben APP werden auch viele andere Typ I und II Membranproteine, wie z.B. Notch und CD44 [98, 102] durch regulierte Intramembranproteolyse (RIP) abgebaut. Dabei handelt es sich um einen zweischrittigen Proteolysemechanismus für die Signaltransduktion und die Degradation von Membranproteinen [103, 104]. Im ersten Schritt, genannt Ektodomänenspaltung „ectodomain shedding“, wird die Ektodomäne des Proteins im Bereich der Juxtamembranregion durch eine sog. „Sheddase“ gespalten (siehe Abb.7). Dabei handelt es sich entweder um Metalloproteasen oder die beiden Aspartylproteasen BACE1 und 2, welche innerhalb der ersten 30-40 membrannahen Aminosäuren der Ektodomäne, der sog. Juxtamembrandomäne, schneiden. Es resultieren die Sekretion des größten Anteils der Extrazellulärdomäne [105, 106] im Fall von Typ-I Membranproteinen ein in der Membran verbleibendes C-terminales Fragment (CTF), welches in einem zweiten Schritt, genannt Intramembranproteolyse, durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex gespalten wird [107]. Im Fall der genau umgekehrt in der Membran sitzenden Typ-II Membranproteine, übernehmen die Signal Peptid Peptidase ähnlichen (signal peptide peptidase like, SPPI) Proteasen die Proteolyse der nach der Sekretion der Ektodomäne in der Membran verbleibenden NTFs. Sie weisen im Vergleich zu den katalytischen Untereinheiten des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes Presenilin 1 (PS1) und 2 (PS2) ebenfalls eine spiegelverkehrte Orientierung in der Membran auf. Die beiden ersten identifizierten Substrate waren  $\text{TNF}\alpha$  und Bri-2 [108-110]. Die aus der RIP von Notch resultierende intrazelluläre Domäne (NICD) ist in der Lage, im Kern die Transkription zahlreicher Gene zu beeinflussen [111], wodurch die Differenzierung verschiedener Zelllinien in multizellulären Organismen kontrolliert wird [112]. Eine Deletion von Notch in Mäusen ist in sich entwickelnden Embryonen durch einen letalen, posterioren Wachstumsstopp mit einer verringerte Anzahl von differenzierten Somiten und nachfolgender, vor allem im Nervensystem lokalisierter

Zelldegeneration charakterisiert [113]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen der RIP durch eine pharmakologische Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase und damit das Fehlen der NICD von Notch zu einem ähnlichen Phänotyp führt [114, 115]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die regulierte Intramembranproteolyse essentiell für die Signaltransduktion von extrinsischen Signalen in den Zellen multizellulärer Organismen und damit einer normalen Embryogenese ist.

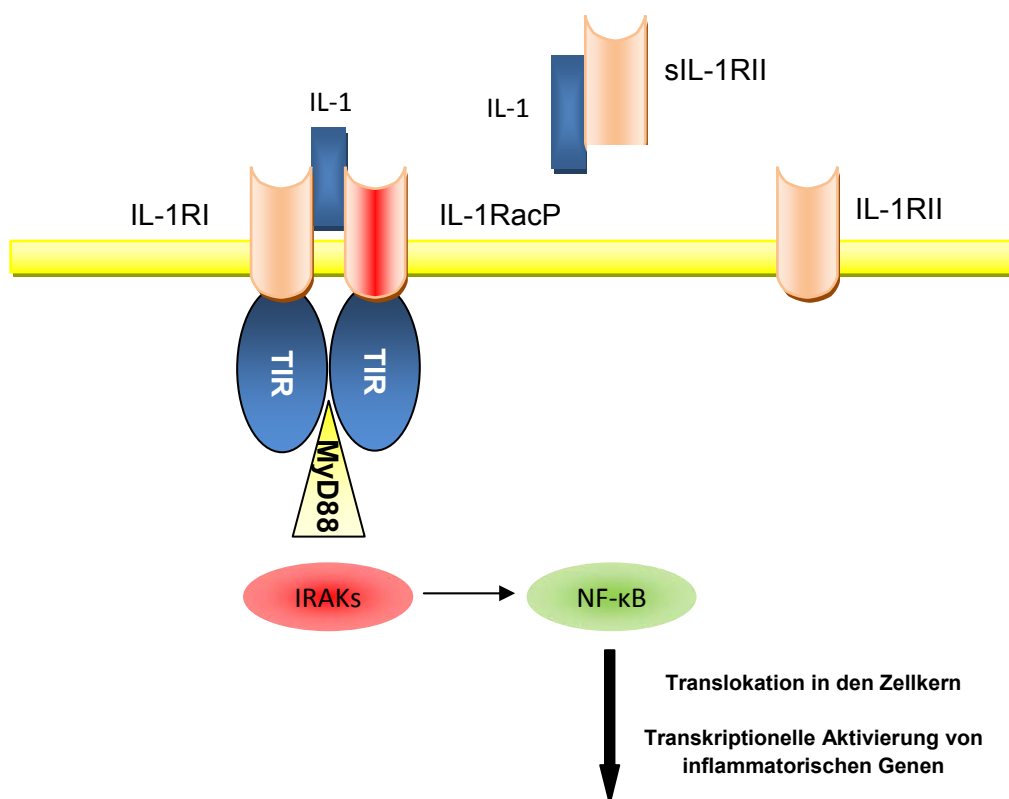


**Abbildung 7: Regulierte Intramembranproteolyse von Typ-1 und Typ-2 Membranproteinen** 1= Sheddase, 2= Signalpeptidpeptidase ähnlich (SPPL), 3=  $\gamma$ -Sekretase. Nach Ektodomänenspaltung durch eine Sheddase wird das in der Membran verbleibende Fragment im Fall von Typ-1 Membranproteinen durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex und für Typ-2 Membranproteine durch SPPL prozessiert.

## 1.6. Interleukin-1 Signaltransduktion und die Alzheimer Krankheit

Mehrere Arbeiten der vergangenen Jahre haben das Interleukin-1 System zumindest mit Teilaspekten der Alzheimerschen Demenz in Verbindung gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) und  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) potente inflammatorische und immunregulatorische Zytokine sind, welche eine Schlüsselrolle in neurodegenerativen Prozessen einnehmen, die sich nach einem Hirntrauma, Schlaganfall oder einer Enzephalitis, abspielen. Dabei kann Interleukin-1 an zwei

verschiedene Typen von Rezeptoren binden. Eine Bindung an den Typ-I Rezeptor (IL-1RI), an deren Anfang die Heterodimerisierung mit dem Interleukin-1 Rezeptor assoziiertem Protein (IL-1racp) [116] und die Assoziation von MyD88 steht [117, 118], führt nach Aktivierung einer Signalkaskade zur Aktivierung von NFκB [119], welches die Transkription von proinflammatorischen Genen steuert (**siehe Abb.8**). Hingegen wirkt der Typ-II Rezeptor (IL-1RII) in seiner sekretierten Form als Abfangrezeptor für IL-1β und IL-1α [120]. Im Gegensatz zum IL-1RI fehlt ihm die zytoplasmatische Toll/Interleukin-1 Rezeptor Domäne (TIR) [121], wodurch es zu keiner NFκB aktivierenden Signaltransduktion fähig ist [122].

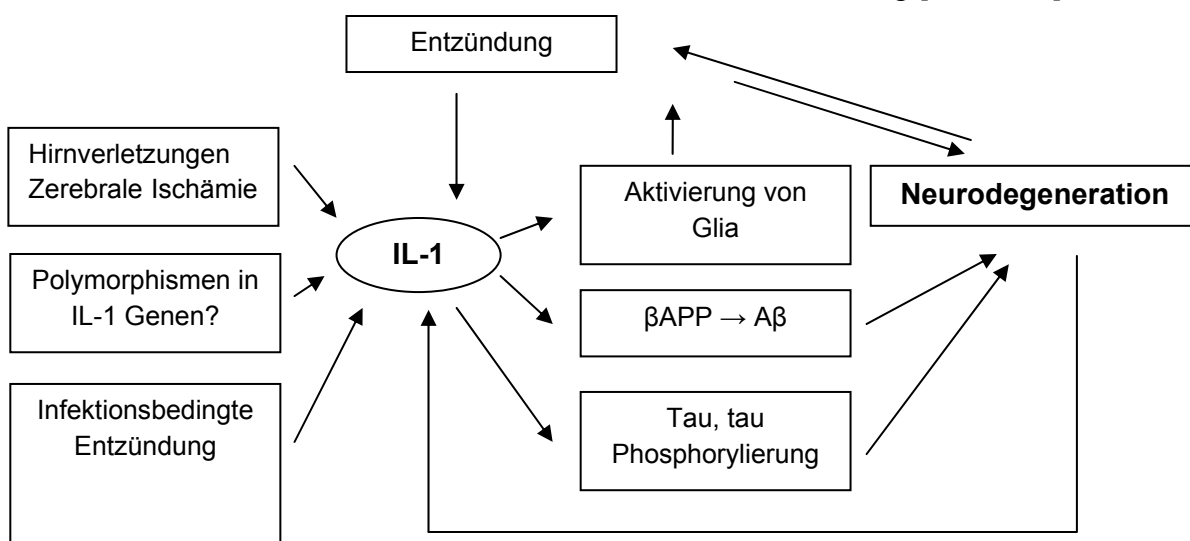


**Abbildung 8 Schematische Darstellung der IL-1 Rezeptoren und ihrer Funktion.** IL-1RI bildet nach Bindung von IL-1 ein Heterodimer mit IL-1RacP und führt damit zur IL-1 abhängigen Signaltransduktion. IL-1RII besitzt keine TIR-Domäne und wird sehr stark sekretiert. Seine lösliche Form bindet und neutralisiert damit IL-1.

IL-1RII ist ein Typ-I Membranprotein mit einer großen extrazellulären, Liganden bindenden Domäne, welche drei Ig-Domänen enthält. Darauf folgt eine Transmembrandomäne und eine im Vergleich zum IL-1RI kurze, 29 Aminosäuren messende zytoplasmatische Domäne. IL-1 und seine Signaltransduktion wurden mit verschiedenen Aspekten der Alzheimerschen Demenz in Verbindung gebracht,

Jedoch ist man noch weit davon entfernt, die darin involvierten molekularen Mechanismen im Detail zu verstehen. Trotzdem gibt es eine Reihe von Indizien, die für eine Rolle von Interleukin-1 in der Alzheimer Pathogenese sprechen. Hirntraumen, welche einen Risikofaktor für Alzheimer darstellen, lösen eine erhöhte Expression von IL-1 aus [123]. Darüber hinaus konnten in Hirnschnitten von an Morbus Alzheimer erkrankten Patienten und Down-Syndrom Patienten erhöhte Level von Interleukin-1 nachgewiesen werden [124]. Des Weiteren führt die Stimulation von Astrozyten, Neuronen und Endothelzellen mit IL-1 zu einer erhöhten Translation und Transkription von APP mRNA und somit zu erhöhten APP-Proteinleveln [125-128]. Dies könnte möglicherweise auch zu einer erhöhten Bildung von A $\beta$  führen. Allerdings führt die Stimulation von Neurogliom- und Neuroblastomzellen mit IL-1 auch zu einer Aktivierung der  $\alpha$ -Sekretase Spaltung [129, 130], welche potentiell in der Lage ist, die Bildung von A $\beta$  zu verhindern und darüber hinaus die Sekretion der neuroprotektiven, neurotrophen Form sAPP $\alpha$  zu stimulieren. Mit IL-1 $\beta$  behandelte Ratten zeigen im Cortex eine Zunahme der Immunreaktivität für phosphoryliertes TAU und eine Zunahme an TAU mRNA [131].

Genetische Kopplungsanalysen haben Polymorphismen in den beiden Interleukin-1 Genen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  mit einer erhöhten Prädisposition für die Alzheimer Demenz in Verbindung gebracht. Interessanterweise scheinen beide Polymorphismen zu einer erhöhten Bildung von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  *in vitro* oder *in vivo* zu führen [132]. Eine weitere mögliche Verbindung zwischen IL-1 und Alzheimer sind erhöhte Level von IL-1RII im Liquor (CSF) von Alzheimer Patienten in milden bis moderaten Stadien, aber nicht in finalen Stadien der Erkrankung [133, 134].



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der vermuteten Wirkmechanismen von Interleukin-1 im Rahmen der Alzheimer Pathogenese.** (Modifiziert nach Rothwell NJ et al. 2000)

Wenn man bedenkt, dass IL-1R2 als Abfangrezeptor für IL-1 dient, könnte dies eine Möglichkeit sein, um die schädlichen Effekte einer erhöhten IL-1 Expression im Gehirn zu limitieren. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, welche die proteolytische Prozessierung und damit die Aktivierung von IL-1R2 steuern, weitgehend unverstanden. Jedoch scheint die Prozessierung zumindest teilweise durch eine Metalloproteaseaktivität vermittelt zu sein [135, 136], welche auf die ADAM Protease TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM17) zurückzuführen sein könnte [137]. Ein detaillierteres Verständnis der Prozessierung von IL-1R2 könnte helfen, die Rolle von IL-1R2 Sekretion und IL-1 im Rahmen der Alzheimerschen Demenz besser zu verstehen.

### 1.7. Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) wird durch  $\alpha$ -  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase proteolytisch prozessiert. Die sequentielle Spaltung von APP durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase führt zu den amyloidogenen A $\beta$ -Peptiden, welche sich in sog. amyloiden Plaques ablagern. Heutzutage wird angenommen, dass A $\beta$  vor allem in Form von Oligomeren eine toxische Wirkung auf Neuronen ausübt. Damit nimmt es eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit ein. Aufgrund erhöhter Konzentrationen von IL-1R2 im Liquor von Alzheimer Patienten wurde die proteolytische Prozessierung und Sekretion des Typ II Interleukin-1-Rezeptors (IL-1R2) ebenfalls mit der Alzheimer Krankheit in Verbindung gebracht. Im Augenblick geht man davon aus, dass IL-1R2 negative Effekte einer zu starken IL-1 Signaltransduktion auf das zentrale Nervensystem abmildert, indem es IL-1 bindet und damit unschädlich macht [133, 134]. Die molekularen Mechanismen der proteolytischen Prozessierung des Typ II IL-1 Rezeptors sind bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch weitgehend unverstanden. Deshalb sollte in dieser Arbeit die proteolytische Prozessierung von IL-1R2 untersucht und mit der proteolytischen Prozessierung von APP verglichen werden.

Speziell sollte untersucht werden, ob es sich analog zu APP bei IL-1R2 um ein  $\alpha$ -Sekretase Substrat handelt. Dazu sollte der Einfluss der beiden Substanzen

**Phorbolmyristate Acetate (PMA)** und **TACE Protease Inhibitor-1 (TAPI-1)** auf die Prozessierung von IL-1R2 in einer humanen embryonalen Nierenzelllinie untersucht werden. PMA ist dabei ein Aktivator der  $\alpha$ -Sekretase Spaltung, während es sich bei TAPI-1 um einen Breitband Metalloproteaseinhibitor und somit um einen Inhibitor der  $\alpha$ -Sekretase Spaltung handelt.

Da die Menge von sekretiertem IL-1R2 und gleichzeitig auch die der  $\beta$ -Sekretase BACE1 in Alzheimer Patienten erhöht ist, sollte untersucht werden, ob IL-1R2 ähnlich wie auch APP durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 prozessiert werden kann. Dafür sollte der Einfluss der Überexpression von BACE1 oder dessen Homolog BACE2 auf die Sekretion von IL-1R2 untersucht werden. Des Weiteren sollten der Effekt des für BACE1 und -2 spezifischen Inhibitors C3 [138] und eines Knockouts von BACE1 und BACE2 auf die Sekretion von IL-1R2 untersucht werden.

Drittens sollte untersucht werden, ob es sich bei dem membranständigen Fragment von IL-1R2 um ein neues  $\gamma$ -Sekretasesubstrat handeln könnte. Dazu sollte der Einfluss des  $\gamma$ -Sekretase Inhibitors DAPT, der proteolytisch inaktiven Presenilin 1 Mutante (D385N) und eines Presenilin 1/2 Knockout auf die Prozessierung der nach der Ektodomänenspaltung in der Membran verbliebenen C-terminalen Fragmente von IL-1R2 untersucht werden. Des Weiteren sollte in einem zellfreien Assay gezeigt werden, dass das C-terminale Fragment von IL-1R2 in von Zellen aufgereinigten Membranen durch den  $\gamma$ -Sekretasekomplex umgesetzt wird.

Viertens sollten die Schnittstellen der einzelnen Proteasen massenspektrometrisch mittels **Matrix assistierter Laser Desorption Ionisation (MALDI)** bestimmt werden.





## 2. Material und Methoden

### 2.1. Molekularbiologische Arbeitstechniken

#### 2.1.1. Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Oligonukleotide wurden von Invitrogen und Thermo bezogen.

**Tabelle 1 Primer:**

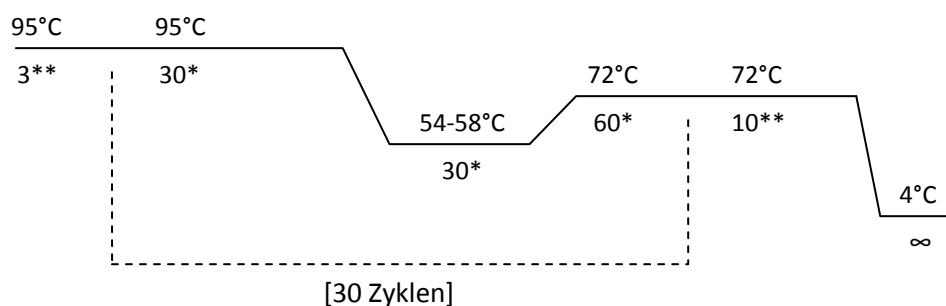
Bezeichnung	Sequenz
CD5-HA-tag fw	5'-TCCTAGCACGGAAGCGACCAGCATCCCCAG-3'
IL1R2-XBA fw	5'-CTAGTCTAGAGGGGGCTGCCAGAAGCTG-3'
IL1R2-XBA rev	5'-GATCTCTAGACCCTTGGGATAGGATTGAAAG-3'
Δ322-IL-1R2-FLAG fw	5'-GATCTCTAGAGGTTGTCCATAATACCCTG-3'
Δ329-IL-1R2-FLAG fw	5'-GATCTCTAGAGACACTACGCACCACAGTC-3'
Δ334-IL-1R2-FLAG fw	5'-GTCGCTTCCGTGCTAGGACAGACACTACGCACCACAG-3'
CD5 annealing N-term Δ334-IL-1R2	5'-TCCTAGCACGGAAGCGACCAGCATCCCCAG-3'
TGF-XBA rev	5'-GATCTCTAGACCGACGAGTGTCTGAGTG-3'
Peak12-Not	5'-TGGATGCAGGCTACTCTAGGG-3'
Peak12-HIND	5'-CATTCTCAAGCCTCAGACAGTGG-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
XbaFLAG	5'-CTAGTCTAGAGGACTACAAGGACGACGACACAAG-3'
pAnNT	5'-GTGCCTGAAGCGGATCCAGAC -3'
P-SelectinSpel	5'-CTAGACTAGTGAAAGAAGTGGCAGCATGGAC -3'
CD16Xba	5'-GGTCTAGAGATGCGGACTGAAGATCTCC -3'
CD14Xba	5'-CTAGTCTAGAGACCACGCCAGAACCTTGTGAGC-3'
TNF4Xba	5'-TACTTCTAGAGAGCCGCCAGGGCAATGATCCC-3'
P-Selectin rev	5'-GACTGCGGCCGCTTAAGGACTCGGGTCAAATGC-3'

Alle PCR Oligonukleotide wurden in Aqua bidest gelöst (ddH<sub>2</sub>O gewonnen in einer MilliQ Plus Filteranlage von Millipore) und in einer Konzentration von 100 μM bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. 10 μM wurden als Arbeitskonzentration verwendet. Folgender Ansatz wurde zusammenpipettiert [Tabelle 2].

**Tabelle 2** Beispielansatz für PCR:

Substanz	Menge
Matrize (100 ng DNA/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Oligonukleotid1 (c = 10 $\mu$ M)	4 $\mu$ l
Oligonukleotid2 (c = 10 $\mu$ M)	4 $\mu$ l
dNTP (Roche) 10 mM	1 $\mu$ l
Pwo-Polymerase (PEQLAB) (1U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10-fach Pwo-Polymerase Puffer (PEQLAB)	5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	34 $\mu$ l
$\Sigma$ =	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

Für kleine PCR-Produkte (<500 bp) wurde alternativ Taq Polymerase (Fermentas) mit dem entsprechenden Puffer (Fermentas) verwendet. Alle Komponenten des PCR-Ansatzes wurden bei 4°C auf Eis gemischt, wobei die DNA-Polymerase als letzte Komponente hinzugegeben wurde. Für längere Amplifikate >500 bp wurde Pwo-Polymerase verwendet, da sie aufgrund ihrer 3'-5' Exonucleaseaktivität nur eine Mutation pro 10000 bp produziert. Der fertige PCR-Ansatz wurde mit folgendem Standard-PCR-Programm in einer PCR-Maschine (Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystems) in Sarstedt-PCR-Reaktionsgefäßen prozessiert.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der einzelnen Phasen einer Standard PCR-Reaktion** Dargestellt sind die einzelnen Phasen einer Polymerasekettenreaktion. Dabei entspricht \* Sekunden und \*\* Minuten. Die innerhalb der gestrichelten Linie angegebenen Phasen werden 30 Mal wiederholt und entsprechen dem Aufschmelzen der DNA-Stränge bei 95°C, dem Annealen der Primer bei 54-58°C und der Amplifikation der DNA bei 72°C.

Die Hybridisierungstemperatur ( $T_{\alpha}$ ) wurde entsprechend der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der PCR-Oligonukleotide angepasst ( $T_{\alpha} = T_m - 2^{\circ}\text{C}$ ). Bei Fusions-PCRs dienten im 2. Schritt PCR-Fragmente als Matrize, die in zwei vorangegangenen PCRs synthetisiert wurden

**Tabelle 3 PCR-Reaktionen:**

Bezeichnung des Fragments	Oligonukleotide	Matrize
XbaI-IL-1R2-NotI	IL-1R2 Xba fw, T7	pCMVSport6/IL-1R2
XbaI-IL-1R2-XbaI	IL-1R2 XbaI fw, IL-1R2 XbaI rev	pCMVSport6/IL-1R2
XbaI-CD14-NotI	CD14XbaI fw, CD14rev	pCDM12-CD14
XbaI-CD16-NotI	CD16XbaI fw, Peak12-Not	CD16 GPI
HindIII- $\Delta$ 334-IL-1R2-FLAG-NotI	Peak12-Hind, CD5 annealing N-term $\Delta$ 334-IL-1R2, $\Delta$ 334-IL-1R2-FLAG fw, Peak12-Not	Peak12-CD5-HA-IL-1R2-FLAG
XbaI- $\Delta$ 329-IL-1R2-XbaI	$\Delta$ 329-IL-1R2-FLAG fw, Peak12-Not	Peak12-CD5-HA-IL-1R2-FLAG
XbaI- $\Delta$ 322-IL-1R2-XbaI	$\Delta$ 322-IL-1R2-FLAG fw, Peak12-Not	Peak12-CD5-HA-IL-1R2-FLAG
HindIII-TGF $\alpha$ -XbaI	Peak12-Hind, TGF $\alpha$ -Xba	Peak12-TGF $\alpha$ -HA neu
XbaI-FLAG-BamHI	Xba-Flag fw, panNT	Peak12-CD4-FLAG
HindIII-Flag-TNF $\alpha$ -XbaI	Peak12-Hind, TNF $\alpha$ -Xba	Peak12-Flag-TNF $\alpha$
SpeI-P-Selectin-NotI	P-SelectinSpeI, Psel rev	pCMV-P-Selectin

### Auftrennung und Aufreinigung der PCR-Fragmente

<b>TAE-Puffer:</b>	40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA (pH 8,0)
<b>Agarose:</b>	(Invitrogen) 1-2% (w/v) gelöst in TAE-Puffer (zur Detektion der DNA wurden jedem Gel 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Ethidiumbromid hinzugefügt). Die gelöste Agarose wurde bei 65°C im Brutschrank bis zu deren Benutzung aufbewahrt
<b>DNA-Auftragspuffer:</b>	30% Glycerol, 10 mM EDTA, 0,05% Orange G (Sigma) in ddH <sub>2</sub> O
<b>DNA-Größenmarker:</b>	1kb Leiter (Sigma) gelöst im DNA Auftragspuffer in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (10 $\mu\text{l}$ pro Spur)
<b>Elektrophoresekammer:</b>	Owl Separation Systems, Inc.
<b>UV-Schirm:</b>	Intas
<b>Drucker:</b>	Mitsubishi

Für die Gelelektrophorese wurden Gele entsprechend der Größe der zu erwartenden Fragmente gegossen. Für Fragmente kleiner 500 bp wurden 2%ige Gele verwendet. Analog wurden 1%ige Gele bei größeren Fragmenten verwendet. Das Gel lief für 30 min bei 120 V. Danach wurde das Agarosegel unter UV-Licht ( $\lambda =$

302 nm) begutachtet, fotodokumentiert und die gewünschten Banden mittels Skalpell ausgeschnitten.

### **2.1.2. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelstücken**

Für die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde das Nucleospin-Kit von Macherey & Nagel entsprechend den Anweisungen des Herstellers verwendet. Aufgereinigte DNA wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.1.3. Subklonierung verschiedener cDNAs in die peak12 Säugerzell-Expressionsvektoren**

#### **Tabelle 4 Verwendete Plasmidvektoren:**

- peak12-CD5/HA	(1)	S. Lichtenthaler
- peak12-CD5/FLAG	(2)	S. Lichtenthaler
- peak12-CD5/HA-XBA-FLAG	(3)	
- peak12-MMP-IRES-GFP	(4)	
- peak12-FLAG-HA	(5)	
- peak12-CD5/HA-SEAP	(6)	S. Lichtenthaler
- peak12	(7)	
- peak12-HA	(8)	

Plasmide, welche mit dem Namen S. Lichtenthaler bezeichnet sind, waren schon zu Beginn dieser Arbeit vorhanden. Sie dienten in dieser Arbeit als Ausgangsvektoren für weitere Klonierungen und wurden schon in einer vorangegangenen Publikation erwähnt [80].

**Tabelle 5** Konstrukte:

Bezeichnung	PCR-Fragment	Klonierungstellen	Plasmidvektor (s. Tabelle 4)
HA-XBA-FLAG	XbaI-Flag-NotI	XbaI/BamH1	8
CD5-HA-XBA-FLAG	CD5-HA	HindIII/XbaI	HA-XBA-FLAG
HA-SEAP-IL1R2	IL-1R2	XbaI/NotI	6
HA-IL-1R2	IL-1R2	XbaI/NotI	1
HA-IL-1R2-FLAG	IL-1R2	XbaI	3
HA-Δ322-IL-1R2-FLAG	Δ322-IL-1R2	XbaI	3
HA-Δ329-IL-1R2-FLAG	Δ329-IL-1R2	XbaI	3
Δ334-IL-1R2-FLAG	Δ334-IL-1R2	HindIII/XbaI	2
MMP-HA-IL-1R2-FLAG-IRES-GFP	HA-IL-1R2-FLAG	HindIII/NotI	4
HA-P-Selectin	P-Selectin	XbaI/NotI	1
FLAG-TNF $\alpha$ -HA	TNF $\alpha$ -HA	HindIII/XbaI	5
TNF $\alpha$ -SEAP	TNF $\alpha$	HindIII/XbaI	7
HA-TGF $\alpha$ -FLAG	HA-TGF $\alpha$ -Neu	HindIII/XbaI	3
HA-SEAP-TGF $\alpha$	TGF $\alpha$	XbaI/NotI	6
HA-CD16	CD16	XbaI/NotI	1
HA-SEAP-CD16	CD16	XbaI/NotI	6
HA-CD14	CD14	XbaI/NotI	1
HA-SEAP-CD14	CD14	XbaI/NotI	6
HA-SEAP-APP	APP	XbaI/NotI	6
HA-SEAP-APP/SWE	APP/SWE	XbaI/NotI	6

Alle in dieser Arbeit verwendeten cDNAs kodieren für Proteine humaner Herkunft.

### Verdau der Vektoren und PCR-Fragmente mit Restriktionsenzymen

Die verwendeten Restriktionsendonucleasen und die dazugehörigen Inkubationspuffer wurden von Fermentas und NEB bezogen und entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

**Tabelle 7** Beispielansatz für Restriktionsverdau (Vektor bzw. PCR-Fragment):

Substanz	Menge	
Vektor oder {PCR-Fragment}	1 $\mu$ l (c = 1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	{20 $\mu$ l}
10x-Puffer	2 $\mu$ l	{ 5 $\mu$ l}
BSA	1 $\mu$ l	
XbaI	1 $\mu$ l	
NotI	1 $\mu$ l	
ddH <sub>2</sub> O	14 $\mu$ l	{22 $\mu$ l}
$\Sigma$ =	20 $\mu$ l	{50 $\mu$ l}

Der oben angegebene Ansatz wurde im Fall von Plasmid-DNA für 1h und im Fall von PCR-Fragmenten für 6h in einem auf 37°C temperierten Heizblock inkubiert. Für die Dephosphorylierung der Vektorenden des linearisierten Vektors wurden anschließend 2 µl Alkalische Phosphatase aus Krabben („Shrimp alkaline phosphatase“, SAP) und die dem Gesamtvolumen entsprechende Menge SAP-Puffer(10x) dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Dieser wurde anschließend erneut für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in einem der Größe entsprechenden Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht ( $\lambda=302$  nm) ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend aus der Agarose aufgereinigt (siehe 2.1.2).

#### Ligation von PCR-Fragmenten und Vektoren:

Zur Ligation von PCR-Fragmenten mit verdauten Vektoren wurde folgender Ansatz verwendet:

**Tabelle 8** Beispielansatz für eine Ligation:

Substanz	Menge	
Dephosphorylierter Vektor	1	µl
PCR-Fragment (verdaut)	4/6	µl
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	2	µl
T4-DNA-Ligase (Roche)	1	µl
ddH <sub>2</sub> O	12/10	µl
$\Sigma=$	20	µl

Nach einer vierstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Transformation in kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  (siehe unten). In schwierigen Fällen erfolgte die Ligation im Kühlraum bei 4°C für 48h.

#### 2.1.4. Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Bakterien vom Stamm DH5 $\alpha$

**TB-Medium:** 10 mM Hepes, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MgCl<sub>2</sub> (Gesamtlösung pH 6,7)

**SOB-Medium:** 0,2% (g/v) Trypton, 0,05% (g/v) Hefeextrakt, 8,5 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>

**LB-Agarplatten:** 1% Trypton (BD), 0,5% Yeast Extrakt (BD) und 0,5% NaCl (Roth) in dH<sub>2</sub>O, pH 7.0 wurde mit NaOH (Merck) eingestellt, 15 g/l Agar (BD) zugesetzt und die Lösung bei 1,2 bar für 20 Min autoklaviert. Nach Abkühlen auf 50°C wurden die Agarplatten gegossen

Am 1. Tag wurden Bakterien vom Stamm DH5 $\alpha$  auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am 2. Tag wurden 100 ml SOB-Medium mit einem von der LB-Agar-Platte entnommenen Klon angeimpft. Diese wurden in einem Schüttel-Inkubator (Certomat BS-1, Braun Biotech International) über Nacht bei 37°C/ 300 upm inkubiert. Am Folgetag wurde diese Kultur mit SOB-Medium soweit verdünnt, dass die Optische Dichte bei 600nm (OD<sub>600</sub>) 0,1 OD entsprach. Die Kultur wurde für weitere 20-24 Stunden inkubiert bis die OD<sub>600</sub> einem Wert von 0,6 OD entsprach. Daraufhin wurde die Kultur für 10 min auf Eis abgekühlt. Die Bakteriensuspension wurde bei 3500 rpm/ 20 min in einer Kühlzentrifuge (Avanti J-20XP, Beckman Coulter) bestückt mit einem JA-10 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 80 ml 4°C kaltem TB-Medium aufgenommen und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt 3500 rpm/ 20 min wurde das Bakterienpellet erneut vorsichtig in 20 ml frischer TB-Lösung resuspendiert. Nach Zusatz von 7% DMSO wurde die Bakteriensuspension für 10 min auf Eis inkubiert, anschließend in 200  $\mu$ l Portionen aliquotiert und diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Aliquots wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.1.5. Transformation von kompetenten *E.coli* DH5 $\alpha$ -Bakterien

**LB-Medium:** (Low Salt Luria-Bertani Medium) 1% Trypton (BD), 0,5% Yeast Extract (BD) und 0,5% NaCl (Roth) in dH<sub>2</sub>O, pH mit NaOH einstellen und bei 120°C/1,2 bar für 20 Min autoklavieren. Ggf. nach Abkühlen die entsprechenden Selektionsantibiotika zusetzen.

**LB-Ampicillin Agarplatten:** siehe (2.1.4), Nach Abkühlen der Agarlösung auf ca. 50°C wurde Ampicillin (Sigma) in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml zugesetzt und danach die Platten gegossen.

**Ampicillin-Stocklösung:** Ampicillin (Sigma) wurde in einer Konzentration von 100 mg/ml in 80% Ethanol gelöst. Nach Sterilfiltration mit einem 0,22  $\mu$ m Filter (Qualilab) wurde die Lösung aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert



60 µl von auf Eis aufgetauten, kompetenten DH5α Bakterien wurden zu einem Ligationsansatz (20µl, siehe oben) hinzugegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock (37°C/ 5 min). Darauf kühlte der Ansatz nochmals für 5min auf Eis ab. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 1ml LB-Medium eine Inkubation für 30min bei 37°C min und 200 upm. Dieser Ansatz wurde auf Ampicillin-LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

#### 2.1.6. Präparation von Plasmidvektoren im kleinen Maßstab (Mini-Präp)

**LB-AMP-Medium:** (Low Salt Luria-Bertani Medium) 1% Trypton (BD), 0,5% Yeast Extract (BD) und 0,5% NaCl (Roth) in dH<sub>2</sub>O, pH mit NaOH einstellen und bei 120°C/1,2 bar für 20 Min autoklavieren. Nach Abkühlen wurde Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt.

**Schüttelinkubator Certomat BS-1 (Braun Biotech International)**

**Tischzentrifuge Biofuge Pico (Heraeus/Thermo)**

Nach Übernachtinkubation der mit transformierten *E.coli* DH5α beimpften Ampicillin-LB-Agar-Platte wurden einzelne Klone mittels einer Pipettenspitze entnommen und in 5ml LB-Amp-Medium transferiert. Nach einer weiteren Übernachtinkubation bei 37°C und 300 upm im Schüttelinkubator wurden 3 ml der Bakteriensuspension bei 8000 rpm zentrifugiert und entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem Nucleospin®Plasmid Kit von Macherey&Nagel aufgereinigt. Die DNA wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### Kontrollverdau von Plasmidvektoren

Durch Mini-Präparation gereinigte Plasmidvektoren wurden mit den gewünschten Restriktionsendonukleasen (Fermentas) entsprechend den Angaben des Herstellers verdaut und anschließend auf einem Agarosegel analysiert (siehe oben).

#### 2.1.7. Sequenzierung von neu klonierten cDNA Konstrukten

Die Überprüfung der Sequenzen per PCR neu hergestellter cDNA-Konstrukte wurde bei der Firma GATC in Konstanz durchgeführt. Im Fall der peak12-Vektoren

wurden P12Hind als Vorwärtsprimer und P12Not als Rückwärtsprimer verwendet. Im Fall von pcDNA3.1-Vektoren wurde T7 als Vorwärtsprimer verwendet (Primer siehe 2.1.1).

### **2.1.8. Präparation von Plasmidvektoren im großen Maßstab**

**Ampicillin (Roth)**

**Schüttelinkubator Certomat BS-1 (B. Braun Biotech International)**

**Nucleobond®PC 500 Kit (Macherey&Nagel)**

**LB-AMP-Medium:** (Low Salt Luria-Bertani Medium) 1% Trypton (BD), 0,5% Yeast Extract (BD) und 0,5% NaCl (Roth) in dH<sub>2</sub>O, pH mit NaOH einstellen und bei 120°C/1,2 bar für 20 Min autoklavieren. Nach Abkühlen wurde Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt.

**Kühlzentrifuge Avanti J20XP (Beckman Coulter)**

**JA-10 Rotor (Beckman Coulter)**

Durch Restriktionsverdau und anschließende Analyse auf einem Agarosegel positiv identifizierte Klone wurden in 250 ml LB-AMP-Medium im Schüttelinkubator über Nacht vermehrt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 6000 upm in einer Kühlzentrifuge bestückt mit einem JA-10 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA aus dem Bakterienpellet entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem Nucleobond®PC 500 Kit aufgereinigt. Die gewonnene Plasmid – DNA wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Sequenzen aller verwendeten Plasmide wurden durch Sequenzierung bei der Firma GATC (Konstanz) verifiziert.

## **2.2. Zellkultur**

### **2.2.1. Zelllinien und Kulturmedien**

#### Basiszelllinien

Als Basiszelllinien wurden humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney, HEK) verwendet, die entweder Ebstein-Barr-Virus-Nuclear-Antigen (HEK293-EBNA) oder das Large-T-Antigen des SV40 Virus (HEK293-T) exprimieren. HEK293-T Zelllinien, welche entweder die katalytisch inaktive Presenilin-1 Mutante D385N oder Wildtyp Presenilin 1 überexprimierten, wurden von Christoph Kaether bereit

gestellt. Darüber hinaus wurden murine embryonale Fibroblasten (MEF) von Wildtyp (MEF PS+/+) und von Presenilin-1/-2 defizienten (MEF PS-/-) Mäusen verwendet, welche von Bart de Strooper, Leuven [139] bereitgestellt wurden. Des Weiteren wurden transformierte afrikanische Nierenzellen verwendet COS-7.

### Zellkulturmedien

Als Basismedium diente Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco), versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Gibco) und 1% PEN/Strep (Penicillin, Streptomycin, Gibco). Für die Selektion stabiler Transfektanten wurden folgende Antibiotika zugesetzt:

Geneticin (G418, Roche)	200	µg/ml
Puromycin (Sigma)	1	µg/ml
Zeocin	200	µg/ml

HEK293 Presenilin1-D385N und HEK293 Presenilin1-wt wurden zur Aufrechterhaltung der Expression mit Zeocin (200 µg/ml) versetzt. MEF PS -/- Zelllinien wurden mit Geneticin (200 µg/ml) versetzt, um für die defizienten MEF PS -/- zu selektionieren.

### **2.2.2. Zellkultivierung**

Sterilbank Hera Safe	(Heraeus)
Zellinkubator Hera Cell	(Heraeus)
Zellkulturschalen	(Nunc, Falcon)
Plastikwaren	(Sarstedt)

Die Zellen wurden in 10cm Kulturschalen in 8ml Kulturmedium (siehe oben) im Zellkulturinkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Passagieren von Zellen und alle anderen Manipulationen erfolgten unter einer Sterilbank (Hera safe, Heraeus). Die Konfluenz der Zellen wurde unter einem Lichtmikroskop (Hundt, Wetzlar) überprüft.

### Zellpassagierung

**PBS:** 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4  
**Plastikwaren, „Falcon-Tubes“ (Sarstedt)**

Das Medium von konfluent bewachsenen Zellschalen wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 ml sterilem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin (Gibco) von der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden anschließend in Reaktionsgefäßen (Falcon-Tubes) bei 1000x g/ 5min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet in frischem Medium vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in der benötigten Verdünnung in neue Zellkulturschalen verteilt. Für die Passagierung von HEK293E, -T und COS-7 Zellen wurde eine 1:10 Verdünnung verwendet. Für MEF-Zellen wurde eine 1:20 Verdünnung verwendet.

### Gefrierkonservierung von Zelllinien

**Einfriermedium:** DMEM mit 10% FCS (v/v) und 10% DMSO (v/v) FLUKA

Das Zellpellet einer 10 cm Zellkulturschale (siehe Zellpassage) wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Einfriergefäße (Sarstedt) transferiert. Nach langsamen Herunterkühlen in Einfrierboxen (Sarstedt) wurden die Zellstocks bei -80°C (kurzfristige Lagerung) bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für eine längerfristige Lagerung wurden die Einfriergefäße nach 2 Wochen in flüssigen Stickstoff überführt. Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (siehe oben) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf neue Zellkulturschalen verteilt. Das Anwachsen der Zellen wurde nach 10 h in einem Lichtmikroskop überprüft.

### 2.2.3. Transfektion und Selektion stabiler Zelllinien

#### Liposomale Transfektion

Zur liposomalen Transfektion von DNA wurden die Zellen am Vortag auf neuen Zellkulturschalen ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von etwa 90% aufwiesen. LipfectAMINE 2000 (Invitrogen) wurde in einem Verhältnis von 3:1 ( $\mu\text{l}$  LipofectAMINE 2000/ $\mu\text{g}$  DNA) eingesetzt. Zuerst wurde Lipofectamine in DMEM verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Gleichzeitig wurde die entsprechende Menge DNA im gleichen Volumen DMEM verdünnt. Nach der Inkubation wurden beide Ansätze miteinander vermischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben.

#### Calciumphosphat Transfektion

<b>Calciumchlorid</b>	CaCl <sub>2</sub> 2,5M
<b>2X-Hepespuffer</b>	280 mM NaCl, 50 mM HEPES Säure, 1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7.05
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	
<b>Vortexer</b>	

Für eine Calciumphosphat Transfektion von DNA [140] wurden die Zellen am Vortag auf neuen Zellkulturschalen ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von circa 70% aufwiesen. Vier Stunden vor Transfektion wurde das Zellkulturmedium gewechselt. 2,5 molares CaCl<sub>2</sub> wurde mit in ddH<sub>2</sub>O verdünnter DNA (0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) in einem Verhältnis von 1:10 gemischt. Anschließend wurde die CaCl<sub>2</sub>/DNA Lösung bei Vortexen des HEPES-Puffers tropfenweise in das gleiche Volumen an 2X HEPES-Puffer gegeben. Darauf wurde die Mischung für 20 min bei RT inkubiert und darauf gleichmäßig auf die Zellen verteilt. 16 h nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

Selektion stabiler Zelllinien

4h nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Am zweiten Tag nach Transfektion wurden die Zellen in verschiedenen Verdünnungen auf 10 cm Schalen verteilt, welche frisches Zellkulturmedium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum enthielten. Nachdem die Zellen ausreichend dicht gewachsen waren (ca. 2-3 Wochen), wurden diese normal passagiert und die Expression in einem Western-Blot überprüft.

**Tab.9** Mit liposomaler Transfektion hergestellte Zelllinien:

<b>Zelllinie</b>	<b>Konstrukt</b>	<b>Ausgangszelllinie</b>	<b>Selektion mit</b>
FLAG-TNF $\alpha$ -HA	FLAG-TNF $\alpha$ -HA	HEK293E	1 $\mu$ g/ml Puromycin
HA-CD14	HA-CD14	HEK293E	1 $\mu$ g/ml Puromycin
HA-CD16	HA-CD16	HEK293E	1 $\mu$ g/ml Puromycin
HA-APP	HA-APP	HEK293E	1 $\mu$ g/ml Puromycin
HA-P-Selectin	HA-P-Selectin	HEK293E	1 $\mu$ g/ml Puromycin
HA-SEAP-CD14	HA-SEAP-CD14	HEK293E	1 $\mu$ g/ml Puromycin
HA-SEAP-APP	HA-SEAP-APP	HEK293E	1 $\mu$ g/ml Puromycin
HA-SEAP-APP/SWE	HA-SEAP-APP/SWE	HEK293E	1 $\mu$ g/ml Puromycin
HA-SEAP-IL1R2	HA-SEAP-IL1R2	HEK293E	1 $\mu$ g/ml Puromycin

**2.2.4. Transduktion von Zellen**

**Sterilfilter 0,22  $\mu$ m (Millipore)**

**Polybrene (Hexadimethrinbromid, Sigma) Vorratslösung 8 mg/ml gelöst in dH<sub>2</sub>O.**

**Fluoreszenzmikroskop (Zeiss)**

Für die Transduktion von Zellen wurde das System des pseudotypisierten, murinen Moloney Leukämie Virus verwendet (MMLV). Dabei handelt es sich um die drei Plasmide pmDET-VSVG, pmDET-GAG/POL und den MMP-Vektor mit dem entsprechenden gewünschten Zieltransgen.

Bei pmDET-VSVG handelt es sich um einen Vektor, der für das Oberflächenglykoprotein des vesikulären Stomatitis-Virus kodiert (VSVG). Deswegen wird in diesem Fall von einem pseudotypisierten MMLV Virus gesprochen, da das ursprüngliche Oberflächenprotein gegen das Oberflächenprotein VSVG ausgetauscht worden ist. Der pmDET-GAG/POL Vektor kodiert für die reverse Transkriptase, die Integrase und weitere Verpackungsproteine des MMLV-Virus. Der

MMP-Vektor enthält zwei lange terminale Wiederholungen (LTRs) zwischen die das Transgen, welches in der Zielzelle exprimiert werden soll, gesetzt wird. Die LTRs besitzen selber eine Aktivität als Promoter, so dass kein zusätzlicher Promoter nötig ist. Alle drei Vektoren zusammen kodieren die minimale genetische Information für die Herstellung replikationsdefizienter MMLV Retroviren.

Zur Herstellung von Viren wurden HEK293-EBNA Zellen in einer zu 80% konfluenten 10 cm Schale mit 10 µg Peak12-MMP-Vektor mit dem gewünschten Transgen und einem hinter einer intraribosomalen Eintrittsstelle (IRES) sitzendem grün fluoreszierenden Protein (GFP), 7 µg pmDET-GAG/POL- und 3 µg pmDET-VSVG-Vektor mittels Calcium-Phosphat-Transfektion transfiziert (siehe 2.2.3). Am 1. Tag nach Transfektion wurde das Medium gewechselt. Gleichzeitig wurden die zu transduzierenden Zellen in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1 oder  $3 \times 10^5$  Zellen/ml Medium) in 6 cm Schalen ausgesät. Am 2. Tag nach Transfektion wurden pro 6 cm Schale, die transduziert werden sollte, 3 ml Medium durch einen Sterilfilter mit 0,45 µm Porengröße filtriert, um danach supplementiert mit 8ng/µl Polybrene auf die Zellen gegeben zu werden. Diese wurden dann über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt und die Zellen normal weiter passagiert. Die Transduktionseffizienz wurde am dritten Tag nach Transduktion an einem Fluoreszenzmikroskop anhand der Fluoreszenz des koexprimierten GFP aus der Qualle *Aquoria victoria* ermittelt.

**Tabelle 10** Hergestellte Zelllinien:

Zelllinie		Konstrukt	Ausgangszelllinie
MEF -/-	HA-IL-1R2-FLAG	MMP-CD5-HA-IL-1R2-FLAG-IRES-GFP	MEF PS-/-
MEF +/+	HA-IL-1R2-FLAG	MMP-CD5-HA-IL-1R2-FLAG-IRES-GFP	MEF PS+/+
293-D385N	HA-IL-1R2-FLAG	MMP-CD5-HA-IL-1R2-FLAG-IRES-GFP	HEK293 PS1 D385N
293-wt	HA-IL-1R2-FLAG	MMP-CD5-HA-IL-1R2-FLAG-IRES-GFP	HEK293 PS1 wt

### 2.2.5. Behandlung von Zellen mit chemischen Substanzen

**Tabelle 11** Folgende Substanzen wurden in dieser Arbeit verwendet:

Substanz	Quelle	Lösungsmittel	Konzentration
DAPT ( $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor)	Merck	DMSO	1 $\mu$ M
TAPI-1 (Metalloproteaseinhibitor)	Peptides International	DMSO	25 $\mu$ M
13-Phorbol-myristate-acetate ( $\alpha$ -Sekretaseaktivator)	Sigma	EtOH	1 $\mu$ M
C3 ( <i>Stachel et al.</i> / $\beta$ -Sekretaseinhibitor)	Calbiochem	DMSO	2 $\mu$ M

Im Fall von DAPT wurde am Vorabend der Zellernte das Zellkulturmedium gegen frisches Zellkulturmedium versetzt mit 1  $\mu$ M DAPT gewechselt. Im Fall von TAPI-1, C3 und PMA wurde das Zellkulturmedium zwei Mal 5 und 4 Stunden vor der Zellernte gegen frisches Medium versetzt mit der jeweiligen Substanz ausgetauscht.

## 2.3. Biochemische Arbeitstechniken

### 2.3.1. Analyse sekretierter alkalischer Phosphatase (SEAP) im Zellüberstand

<b>SEAP-Puffer:</b>	0,1 M Glycin, 1 mM $MgCl_2$ , 1 mM $ZnCl_2$ pH 10,4
<b>Substratpuffer:</b>	SEAP-Puffer mit pnPP 1x
<b><math>Na_2</math>-4-Nitrophenolphosphat <math>6 \cdot H_2O</math> (pnPP):</b>	c = 100 $\mu$ g/ $\mu$ l (100x) in ddH <sub>2</sub> O (Sigma)
<b>ELISA-Plattenleser (Tecan Spectra)</b>	
<b>24 Well Platte (Nunc)</b>	
<b>Kühlzentrifuge Biofuge Fresco</b>	(Heraeus/Thermo)

Am Vortag in einer mit Poly-D-Lysin beschichteten 24Well Platte ausgesäte HEK293- EBNA Zellen wurden 48 h vor Beginn der Messung mit den entsprechenden SEAP cDNA-Konstrukten (siehe 2.1.3 Konstrukte) transfiziert. Am Tag der Messung wurden 500  $\mu$ l Zellkulturüberstand aus einem 24Well entnommen und anschließend bei 13000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus) für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l des von Zellüberesten gereinigten Überstandes bei 65°C für 30 min inkubiert, um die Aktivität der endogenen



Phosphatasen zu inaktivieren. 20 µl des hitzeinaktivierten Überstandes wurden zusammen mit 200 µl Substratpuffer in ein 96Well gegeben. Anschließend wurde diese Mischung bei 37°C für 15min inkubiert, so dass eine Verfärbung des Überstandes in den gelben Bereich bemerkt werden konnte. Die Messung der Absorption der Farbreaktion erfolgte bei 405 nm zu mehreren Zeitpunkten in einem Elisa-Plattenleser. Als Kontrolle diente der hitzeinaktivierte Zellkulturüberstand (s.o.) nicht mit SEAP transfizierter HEK293-EBNA Zellen.

### 2.3.2. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

<b>PBS:</b>	140 mM NaCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KCl, 1,75 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
<b>Fixationsmedium:</b>	4% Paraformaldehyd, 4% Saccharose
<b>Puffermedium:</b>	50 mMol Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl) in PBS
<b>Permeabilisationspuffer:</b>	0,1 - 0,2% Triton-X100 (Sigma) in PBS
<b>Blockmedium:</b>	1% BSA, 1% FCS, 0,1% Gelatine gelöst in PBS
<b>Mowiol (Roth):</b>	15% Mowiol in dH <sub>2</sub> O
<b>Deckgläser (Roth)</b>	
<b>Konfokales Fluoreszenzmikroskop (Zeiss)</b>	
<b>LSM Image Examiner (Zeiss)</b>	

Auf Deckgläsern (coverslips) gewachsene, transient transfizierte COS7-Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit 4°C kaltem PBS für 20 min in Fixationsmedium (4°C) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 4°C kaltem PBS wurden die Zellen für 2 min in 4°C kaltem Puffermedium inkubiert. Im Fall von zytoplasmatischen Proteinen erfolgte eine Inkubation der Zellen mit Permeabilisationspuffer für 2 min. Darauf folgten 2 weitere Waschvorgänge mit eiskaltem PBS, woraufhin die Zellen für 10 min mit Blockmedium inkubiert wurden. Anschließend folgte eine 30minütige Inkubation mit einem Primärantikörper verdünnt in Blockmedium, um anschließend 2 Mal mit PBS gewaschen zu werden. Darauf erfolgte eine weitere 30minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper verdünnt in Blockmedium, um zum Schluss noch 2 Mal mit PBS gewaschen zu werden. Abschließend wurden die Deckgläser auf einem Filterpapier getrocknet und danach mit der bewachsenen Seite mittels Eindeckmedium (Mowiol) auf einem Glasobjektträger fixiert, um danach für 30 min bei RT zu trocknen. Die Deckgläser wurden bis zur Auswertung dunkel und trocken bei Raumtemperatur gelagert. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Für den grünen

Kanal (Alexa 488) wurde ein 488 nm Laser mit einer Emissionsstärke von 9% und der Breitpassfilter mit einer Wellenlänge von 505-530 nm verwendet. Für den roten Kanal (Alexa 594) wurde ein 543 nm Laser mit einer Emissionsstärke von 24% und einem Tiefpassfilter mit einer Wellenlänge von 560 nm verwendet. Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem LSM Image Examiner ausgewertet.

**Tabelle 12** Für Immunfluoreszenz verwendete Primärantikörper:

Antikörper	Firma	Herkunft	Verdünnung
HA-7	(Sigma)	Maus	1:1000
BACE-NT	(Sigma)	Hase	1:1000

**Tabelle 13** Für Immunfluoreszenz verwendete Sekundärantikörper:

Antikörper	Firma	Herkunft	Verdünnung
Alexa-488 anti-rabbit	(Molecular Probes)	Hase	1:500
Alexa-594 anti-mouse	(Molecular Probes)	Maus	1:500

### 2.3.3. Zelllyse und Immunpräzipitation

**STEN-Lyse-Puffer:** 150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 2 mM EDTA, 1% NP40 (USBiological) in dH<sub>2</sub>O

**STEN-Puffer:** 150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 2 mM EDTA, 0,5% NP40 in dH<sub>2</sub>O

**STEN-Puffer-NaCl:** 500 mM NaCl, 50 mM TRIS, 2 mM EDTA, 0,5% NP40 in dH<sub>2</sub>O

**STEN-Puffer-SDS:** 150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,5% NP40 in dH<sub>2</sub>O

**STED-Lyse-Puffer:** 150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 2 mM EDTA, 1% DDM (Calbiochem)

**STED-Waschpuffer:** 150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 2 mM EDTA, 0,1% DDM (Calbiochem)

**STE-Waschpuffer:** 150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 2 mM EDTA

**STE-CHAPSO-Puffer:** 150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 2 mM EDTA 1% CHAPSO (Calbiochem)

**CHAPSO-Waschpuffer:** 150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 2 mM EDTA, 0,1% CHAPSO (Biomol)

**PI-Mix (Sigma):** Eingesetzt entsprechend den Angaben des Herstellers (2µl PI-Mix (Sigma) auf 1ml Reaktionslösung, 1:500)

**PAS (Protein-A-Sepharose):** Protein-A-Sepharose (Invitrogen) wurde mit einer Konzentration von 0,1 g/ml in STEN gelöst, mit 2 mg/ml BSA (NEB) versetzt und 1 Stunde bei 4°C geschüttelt. Nach Aliquotierung erfolgte die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

**Kühltischzentrifuge Biofuge Fresco** (Hereaus)

**Ultrazentrifuge Optima** (Beckman Coulter)

**TLA-55 Rotor** (Beckman Coulter)

**Überkopfschüttler** (GFL)

**BCA-Reagenz** (PIERCE)

**HA-, FLAG M2-Agarose** (Sigma)

Standardlyse

Die Zellen jeder einzelnen Schale wurden entsprechend mit einer der Größe angepassten Menge (s. Tabelle) an 4°C kaltem STEN-Lyse-Puffer (+PI-Mix) auf Eis für 15 min lysiert. Daraufhin wurden die restlichen an der Oberfläche haftenden Zellen im Lysis-Puffer resuspendiert. Nach einem reinigenden Zentrifugationsschritt mit 16.000 xg / 4°C / 5 min wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde mittels des BCA-Reagenz nach Angaben des Herstellers bestimmt.

**Tabelle 14** Lysevolumen:

Schalentyp	Menge an Lysispuffer
24Well-Platte	300 µl
6 cm Schale	500 µl
10 cm Schale	1000 µl

Standardimmunpräzipitation

Vor dem Ansetzen der Immunpräzipitation wurde das Lysat mit 30 µl PAS vorgereinigt (30 min/ 4°C / 200 upm) gefolgt von einem Zentrifugationsschritt bei 3600 xg / 4°C / 5 min, um unspezifische Bindungen zu verringern. Das Lysat wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der unten angegebene Ansatz wurde für 2 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die PAS jeweils 1 Mal mit 4°C kaltem STEN-NaCl, STEN-SDS und STEN gewaschen. Der nach dem Waschen auf der PAS verbliebene Puffer wurde mittels einer Hamilton Pipette abgenommen. Anschließend wurde die PAS in 25 µl 4X Laemmli-Probenpuffer 5min bei 95°C aufgekocht.

**Tabelle 15** Ansatz zur Immunpräzipitation:

Substanz	Menge
Zelllysät Volumen entsprechend C <sub>Protein</sub>	100 µg
PAS	30 µl
Antikörper	1-2 µl
STEN-Lyse-Puffer (+PI-MIX)	Ad 500 µl

### Immunpräzipitation von Proteinen für die massenspektrometrische Analyse

Für die Massenspektrometrie wurden zehn transient exprimierende 10 cm Schalen in jeweils 1 ml STED-Lyse-Puffer wie oben beschrieben lysiert. Zu 10 ml Lysat wurden 80 µl HA Agarose oder FLAG M2 Agarose zugegeben und für 2 h bei 4°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Agarose dreimal mit je 1,5 ml STED-Waschpuffer, dreimal mit je 1,5 ml STE-Waschpuffer und abschließend einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Bei sezernierten Proteinen wurden 50 ml über Nacht konditionierter Zellkulturüberstand durch Zentrifugation bei 4°C / 4600 rpm / 15 min von intakten Zellen befreit. Im Fall von HA-Epitopkonjugierten Proteinen wurden anschließend 50 µl HA – Agarose zugegeben und für 2 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die HA-Agarose jeweils dreimal mit 1,5 ml STED – Waschpuffer, STE – Waschpuffer und abschließend einmal mit 1,5 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Zwischen jedem Waschgang wurde die Agarose bei 8000 upm in einer Kühlzentrifuge für 2 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die an die Agarose gebundenen Proteine entweder durch Aufkochen mit 4X Laemmli-Puffer oder mit HA-oder Flag M2-Peptid von der Agarose gelöst (siehe 2.3.4).

### Co-Immunpräzipitation des $\gamma$ -Sekretase-Komplex

HEK293T Zellen einer konfluent bewachsenen 10cm Schale, welche entweder PS1 D385N oder PS1 wt mit oder ohne HA-IL-1R2-FLAG koexprimierten, wurden in 1 ml CHAPSO-Lysepuffer + PI-Mix (1:500) für 20 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die verbliebenen an der Schalenoberfläche anhaftenden Zellen mit einer Pipette im Lysispuffer resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einem reinigendem Zentrifugationsschritt in einer Kühltischzentrifuge bei 15000 rpm/ 5 min, 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend in einer Ultrazentrifuge bestückt mit einem TLA-55 Rotor für weitere 30 min bei 55000 rpm zentrifugiert. Zum gereinigten Überstand wurden 15 µl Anti-HA Agarose hinzugegeben und für 45 min in einem Überkopf-Schüttler bei 4°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 8000 rpm in einer Kühltischzentrifuge wurde der in ein neues Reaktionsgefäß überführte Überstand mit 20 µl Anti-FLAG M2 Agarose versehen und für 2 h in einem Überkopf-Schüttler bei 4°C inkubiert.

Daraufhin wurde die Anti-Flag M2 Agarose abwechselnd bei 8000 rpm abzentrifugiert und anschließend zweimal mit 1 ml CHAPSO-Waschpuffer und einmal mit 1 ml STE-Waschpuffer gewaschen. Zuletzt wurde die Anti-FLAG M2 Agarose in 25 µl Laemmli-Puffer für 5min bei 95°C aufgeköcht. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-Page und Western Blot analysiert.

**Tabelle 16:** Zur Immunpräzipitation verwendete Antikörper

Antikörper	Epitop	Verdünnung	Quelle	Herkunft
Anti-HA 1.1	YPYDVPDYA	1:250	Covance	Maus
Anit-HA Agarose	YPYDVPDYA	-	Sigma	Maus
Anti-Flag M2 Agarose	DYKDDDDK	-	Sigma	Maus

#### 2.3.4. Peptidelution von immunpräzipitierten Proteinen

<b>HA-Peptid (Sigma)</b>	C = 1 mg/ml gelöst in Elutionspuffer
<b>FLAG M2-Peptid (Sigma)</b>	C = 1 mg/ml gelöst in Elutionspuffer
<b>Elutionspuffer</b>	10 mM TRIS/HCL (pH 7,4 eingestellt mit HCL), 150 mM NaCl
<b>Thermomixer (Eppendorf)</b>	

100 µl Elutionslösung wurden auf 80 µl Agarose gegeben und anschließend für 1 h bei 37°C in einem temperierbaren Schüttler bei 300 upm inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und entsprechend der Fragestellung weiterbearbeitet. Die eluierten Beads wurden darauf in 4X Laemmli Probenpuffer für bei 95°C aufgeköcht und auf ein SDS-Gel neben das eluierte Protein aufgetragen, um die Effizienz der Elution zu überprüfen.

### 2.3.5. Deglykosylierung von peptideluiertem Protein (IL-1R2-Ektodomäne) und anschließende massenspektrometrische Analyse

**Glykoprotein Deglykolysierungs Kit (Calbiochem, Cat No. 362880)** enthält unter anderem:

N-Glycosidase F

5X Reaktionspuffer

**Peptideluiertes Protein**

**Zip-Tip C4 (Millipore)**

**Sinapinsäurematrix** Eine Spatelspitze Sinapinsäure gelöst in 1 ml 0,6% Trifluoressigsäure (TFA) in H<sub>2</sub>O (Lichrosolv, Merck) und 30% Acetonitril (Chromasolv, Sigma-Aldrich)

**Massenspektrometer MALDI Destr (Applied Biosystems)**

20 µl (dies entspricht ungefähr 5 µg) aufgereinigte IL-1R2 Ektodomäne wurden mit dH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 35 µl gebracht. Anschließend wurden 10 µl des 5X Reaktionspuffer und 1 µl N-Glykosidase-F hinzu gegeben. Der gesamte Ansatz wurde bei 37°C in einem Thermomixer (Eppendorf) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 20 µl des Gesamtansatzes mit einer C4 Zip-Tip entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend mit 2 µl Sinapinsäurematrix eluiert, auf einer Probenplatte luftgetrocknet und darauf mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer im linearen Modus vermessen.

### 2.3.6. Massenspektrometrische Analyse immunpräzipitierter Peptide mittels Matrix assistierter Laser Desorptions Ionisation (MALDI)

**Inkubationsmedium:** DMEM, 1% FCS, 1% Pen/Strep

**DDM-Waschpuffer:** 10 mM TRIS, 10 mM NaCl, 0,1% DDM

**STE-Waschpuffer:** 10 mM TRIS, 10 mM NaCl

ddH<sub>2</sub>O

**HA-Agarose (Sigma)**

**PI-Mix (Sigma)**

**Massenspektrometer MADLI Destr (Applied Biosystems)**

**Hydrophobe Probenplatte (Applied Biosystems)**

**Software Data Explorer (Applied Biosystems)**

**Elutionslösung:** 2,5% Trifluoressigsäure (TFA), 48,6% H<sub>2</sub>O HPLC-Grad (Lichrosolv, Merck), 48,6% Acetonitril (Chromasolv, Sigma-Aldrich), gesättigt mit α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure (α-Cyano-4hydroxycinnamic acid) Sigma-Aldrich

**Kühltischzentrifuge Biofuge Fresco (Hereaus)**

**Gelloader-Pipettenspitzen (Eppendorf)**

40 ml Inkubationsmedium von 4 transient transfizierten, konfluent mit 293E – Zellen bewachsenen 10 cm Zellkulturschalen wurden nach einer vierstündigen

Inkubationsperiode sofort auf 4°C gekühlt und mit PI-Mix 1:500 supplementiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4600 rpm/ 4°C für 15 min wurde dem in ein neues Reaktionsgefäß überführten Überstand 40 µl HA-Agarose hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit auf einem Überkopfschüttler für 1 h wurde die HA-Agarose jeweils dreimal mit 1,5 ml DDM-Waschpuffer, dreimal mit 1,5 ml STE-Waschpuffer und abschließend einmal mit 1,5 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Überbliebene Waschlösung wurde anschließend mittels Gelloader-Pipettenspitzen von der HA-Agarose abgenommen. Zur Herstellung der Elutionslösung wurden alle Komponenten (*siehe oben*) bis auf α-Zimtsäure gemischt. Anschließend wurde eine kleine Spatelspitze α-Zimtsäure auf 1 ml Gesamtmenge Elutionslösung gegeben, um darauf nach kurzem Vortexen (Vortex Man 2, 800 upm) für 10 min bei Raumtemperatur zu ruhen. Anschließend wurden 30 µl Elutionslösung auf die HA-Agarose gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elutionslösung wurde abgenommen und pro Auftragungspunkt jeweils 1-2 µl auf eine hydrophobe Probenplatte aufgetragen. Nach der Lufttrocknung der Proben wurden diese mittels eines MALDI-TOF Massenspektrometers im Reflektor- oder im linearen Modus gemessen und anschließend die Massenspektren mit der Software Data Explorer analysiert.

### 2.3.7. Massenspektrometrische Identifikation von Trypsinpeptiden aus Blaugelbanden mittels Elektrosprayionisation

#### Q-Star (Applied Biosystems)

Ammoniumbicarbonatpuffer (Ambic) 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

Elutionslösung 0,1% Ameisensäure (Merck), 50% Methanol in H<sub>2</sub>O HPLC-Grad (Lichrosolv, Merck)

Trypsin Seq. grade (Promega) in Ambic 0,02 µg/µl

Zip-Tip C18 (Eppendorf)

Acetonitril (Chromasolv, Sigma)

H<sub>2</sub>O (Lichrosolv, Merck)

Ausgeschnittene mit Coomassie gefärbte Polyacrylamidgelbanden (siehe 2.3.12) oder immunpräzipitiertes, mit Peptid eluiertes Protein wurden mit 2 Einheiten Trypsin in 50 µl Ammoniumbicarbonatpuffer (Ambic) über Nacht verdaut. Im Fall von Blaugelbanden wurden diese vor dem Verdau entfärbt, indem die Gelstücke mehrmals hintereinander mit H<sub>2</sub>O, dann mit 50% (v/v) ACN in H<sub>2</sub>O und danach mit 100% ACN gewaschen wurden. Nachdem Verdau wurde der Überstand

abgenommen und davon 10 µl mittels Zip-Tip entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die entsalzten Peptide wurden in 10 µl Elutionslösung aufgenommen und mit einem Q-Star im LC-MS/MS Modus gemessen. Die Peptide wurden mit dem Elektrosprayionisationsmassenspektrometer gemessen. Die gewonnenen Daten wurden gegen eine Datenbank (Mascot in House) verglichen.

### 2.3.8. In-Vitro Verdau von IL-1R2 Juxtamembrandomänen Peptid mit BACE2

<b>IL-1R2 Juxtamembranpeptid</b>	(Synthetisieren lassen bei Rackwitz)
<b>In-Vitro Assay Puffer</b>	40 mM Na <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> pH 4,4
<b>Aufgereinigtes IG-BACE2</b>	(Regina Fluhrer)
<b>α-Cyano-4-Hydroxymizsäure Matrix</b>	
<b>C18 Zip Tip (Millipore)</b>	
<b>MALDI-TOF Massenspektrometer</b>	(Applied Biosystems)

50 pmol Peptid und 1 µl aufgereinigtes IG-BACE2 (0,1 µg/µl) wurden in 40 µl In-Vitro-Assay Puffer aufgenommen. Anschließend wurde entweder 2 µM C3 oder als Kontrolle die entsprechende Menge an DMSO hinzu gegeben. Der gesamte Ansatz wurde bei 37°C in einem Thermomixer bei 200 upm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 µl des Gesamtansatzes mittels C18 Zip Tip entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt und mittels MALDI-TOF gemessen (siehe 2.3.6)

### 2.3.9. γ- Sekretase In-Vitro Substratverdau

**MOPS-Puffer:** 10 mM MOPS pH 7.0, 10 mM KCL, 5 mM EDTA, 1 mM 1,10-Phenanthrolin (Sigma)  
**Citrat-Puffer:** 150 mM Natrium-Citrat pH 6.4, 5 mM EDTA, 1 mM 1,10-Phenanthrolin (Sigma)  
**PBS (siehe 2.3.2)**  
**Inkubationspuffer:** Citratpuffer + PI-Mix 1x  
**Kühlzentrifuge:** Biofuge Fresco (Haereus)  
**PI-Mix (Roche) 10x**  
**Ultrazentrifuge Optima MAX-E bestückt mit TLA-55 Rotor (Beckman Coulter)**

Die in 10 cm Schalen wachsenden Zellen wurden nach Absaugen des Zellkulturmediums zwei Mal mit PBS (4°C) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mittels eines Schabers (Costar, Corning) vorsichtig abgelöst und in 1 ml PBS (4°C) aufgenommen, um darauf in einer Kühlzentrifuge bei 1000 upm zentrifugiert zu



werden. Das Pellet einer 10 cm Schale wurde in 0,5 ml MOPS-Puffer (4°C) aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Homogenisierung wurden die Zellen 10 Mal durch eine Nadel (14 gauge) aspiriert und daraufhin für 15 min bei 3200 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei 16000 upm für 40 min bei 4°C zentrifugiert. Das resultierende Membranpellet wurde nochmals in 1ml MOPS resuspendiert und für weitere 20 min bei 16000 upm/4°C zentrifugiert. Die pelletierte Membranfraktion wurde in 60 µl Inkubationspuffer aufgenommen. Der Inkubationsansatz setzte sich nach folgendem Schema zusammen.

**Tabelle 17** Inkubationsansatz:

Substanz	Menge
Isolierte Membranfraktion	11 µl
Inkubationspuffer	13 µl
DAPT 25 µM / DMSO	1 µl
Σ=	25 µl

Dieser Ansatz wurde für 2h entweder bei 4°C oder bei 37°C mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT (25 µM) oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Anschließend wurden Überstand und Membranen in einem Ultrazentrifugationsschritt mit 55.000 upm in einer Ultrazentrifuge (Beckman/Coulter) bestückt mit einem TLA-55 Rotor für 1h bei 4°C zentrifugiert. Zuletzt wurden Überstand und Pellet getrennt, jeweils in Laemmli-Probenpuffer gekocht und beide Ansätze auf ein TRIS/Tricine/SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (siehe 2.3.10.).

### 2.3.10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot

SDS-Gele:

<b>4X Laemmli-Puffer</b>	0,25 M TRIS/HCL pH 6,8, 8 % SDS (v/v), 40 % Glycerin (v/v), 10 % $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v), 1 Spatelspitze Bromphenolblau, in dH <sub>2</sub> O.
<b>4X Lower TRIS:</b>	1,5 M TRIS pH 8,8, 0,4 % SDS (v/v) in dH <sub>2</sub> O.
<b>4X Upper TRIS:</b>	0,5 M TRIS pH 6,8, 0,4 % SDS (v/v) in dH <sub>2</sub> O.
<b>10X TRIS-Glycine:</b>	0,24 M TRIS Base, 0,2 M Glycine (v/v) (Roth), dH <sub>2</sub> O ad 5 L (für 10X TRIS-Glycine/SDS, zusätzlich 0,1% SDS (v/v))
<b>TEMED</b>	(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Roth)
<b>Ammoniumpersulfat</b>	(APS, Sigma): 10 % (w/v) gelöst in dH <sub>2</sub> O.

Mini-Protean Minigelsystem	(Biorad)
Netzteil Powerpac 300	(Biorad)
Gelständer, -platten und -kämme	(Biorad)
Molekulargewichtsmarker See blue plus 2	(Invitrogen)

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Größe aufgetrennt. Für die SDS-Gelelektrophorese wurde das Mini-Gelsystem von Biorad entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden ausschließlich 1,5 mm dicke Gele mit 15 Taschen verwendet. Die in der Tabelle angegebenen Mengen sind ausreichend für je 2 Gele von 1,5 mm Dicke (7,5 ml Trenngel, nach dem Aushärten überschichtet mit ca. 2,5 ml Sammelgel) Gelplatten, Gießständer und Gelkammern wurden von der Firma Biorad bezogen (Miniprotean System). Als Gellaufpuffer diente TRIS-Glycin/SDS Puffer.

**Tabelle 18** Zusammensetzung für TRIS-Glycine-Polyacrylamidgele:

	8% Gel	10% Gel	12% Gel	15% Gel
<b>Trenngel</b>				
Acrylamid 40% (Serva)	7,8 ml	6,66 ml	6 ml	4 ml
ddH <sub>2</sub> O	4,2 ml	5,33 ml	6 ml	8 ml
4X Lower TRIS	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
APS	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
<b>Σ=</b>	<b>16 ml</b>	<b>16 ml</b>	<b>16 ml</b>	<b>16ml</b>
<b>Sammelgel</b>				
Acrylamid 40% (Serva)	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
Aqua bidest	6,5 ml	6,5 ml	6,5 ml	6,5 ml
4X Upper TRIS	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
APS	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
<b>Σ=</b>	<b>10,3 ml</b>	<b>10,3 ml</b>	<b>10,3 ml</b>	<b>10,3 ml</b>

Das Einlaufen der Proteine ins Gel findet bei 80 V statt, bis die Proteine das Trenngel erreicht haben. Die darauffolgende Auftrennung findet bei 120 – 130 V statt. Zur Auftrennung der verschiedenen Proteine wurden 20 µg Protein mit der entsprechenden Menge 4X Laemmli-Puffer versetzt und nach Erhitzen für 5 min bei 95°C auf ein Gel mit der gewünschten Prozentzahl aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurden 7 µl „See blue plus 2“ (Invitrogen) verwendet.

### 2.3.11. Auftrennen von Proteinen mit kleinem Molekulargewicht

<b>Acrylamid-Lösung</b>	49,5% Acrylamid (v/v) (total SERVA), 3% Bis-Acrylamid (v/v) (SERVA) in dH <sub>2</sub> O
<b>Gelpuffer</b>	3 M TRIS/HCL, 0,3% SDS (v/v)
<b>Glycerol</b>	32% Glycerol in dH <sub>2</sub> O (v/v)
<b>Anodenpuffer</b>	1 M TRIS/HCL pH 8,9
<b>Kathodenpuffer</b>	0,1 M TRIS/HCL, 1 M Tricine (Biomol), 0,1% SDS
<b>Netzteil Powerpac 300</b>	(Biorad)
<b>Mini-Protean Minigelsystem</b>	(Biorad)
<b>Gelstände, -platten und -kämme</b>	(Biorad)
<b>Molekulargewichtsmarker See blue plus 2</b>	(Invitrogen)

Zur Auftrennung von Proteinen mit kleinem Molekulargewicht (IL-1R2-CTF, Pen-2, ..) wurde das Zweistufensystem-Gelsystem nach Schagger verwendet [141]. Dazu wurden gleichzeitig zu beiden Trenngelmischungen die entsprechenden Mengen an APS gegeben. Darauf wurde zuerst die 2. Trenngelstufe in die Gelkammer gegeben. Anschließend wurde die Gelkammer in eine 45° Stellung gebracht und die 2. Trenngelstufe langsam mit der 1. Trenngelstufe überschichtet damit ein gleichmäßiger Gradient entsteht.

**Tabelle 19** Zusammensetzung für TRIS-Tricine-Polyacrylamidgele:

Substanz	Trenngel (2. Stufe)	Trenngel (1. Stufe)	Sammelgel
<b>Acrylamidlösung</b>	3,5 ml	1,5 ml	0,5 ml
<b>Gelpuffer</b>	3,5 ml	2,5 ml	1,55 ml
<b>Aqua bidest</b>	-	3,5 ml	4,2 ml
<b>Glycerin</b>	3,5 ml	-	-
<b>10% APS</b>	32,5 µl	35 µl	25 µl
<b>TEMED</b>	3,25 µl	4 µl	5 µl
<b>Σ</b>	<b>10,5 ml</b>	<b>7,5 ml</b>	<b>6,7 ml</b>

Die in der Tabelle angegebenen Mengen sind ausreichend für je 2 Gele von 1,5 mm Dicke (6 ml Trenngel, nach dem Aushärten überschichtet mit ca. 3 ml Sammelgel). Gelplatten, Gießstände und Gelkammern wurden von der Firma Biorad bezogen (Miniprotean System). Als Gellaufpuffer diente TRIS-Glycin/SDS Puffer. Das Einlaufen der Gele fand bei 80 V, die darauffolgende Auftrennung bei 120 – 130 V (Biorad, Powerpac 300 oder 1500) statt.

### 2.3.12. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

<b>Färbelösung</b>	50% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure (), 1% (w/v) Coomassie-Blue-R (FLUKA,27816), in dH <sub>2</sub> O
<b>Entfärbelösung</b> <b>dH<sub>2</sub>O</b>	5% (v/v) Isopropanol 7% (v/v) Essigsäure, in dH <sub>2</sub> O
<b>Vakuumheizgetrockner</b>	<b>Slab Gel Dryer (Savant)</b>

Nach Auftrennung der Proteine wurde das SDS-Gel einmal kurz mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, um überschüssige Salze und Pufferkomponenten zu entfernen. Danach wurde das Gel auf einem Schüttler bei 200 upm für 1 h bei RT in Färbelösung geschwenkt. Anschließend erfolgte die Entfärbung unter mehrmaligem Wechseln des Entfärbers bis ein adäquates Verhältnis zwischen Banden- und Hintergrundfärbung entstanden war. Die Gele wurden zur Dokumentation eingescannt, anschließend auf einem Vakuumheiztrockner über Nacht bei 50°C getrocknet und archiviert.

### 2.3.13. Western Blot

<b>PBS-Tween</b>	140 mM NaCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O, 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCL 1% Tween-20 (Merck) in dH <sub>2</sub> O gelöst
<b>Block-Milch</b>	5 % Magermilchpulver (Töpfer), 1 Spatelspitze Natriumazid (Sigma), gelöst in PBS-Tween
<b>I-Block</b>	1 g I-Block Pulver (Tropix), 500 µl Tween-20, PBS ad 500 ml mischen, in der Mikrowelle aufkochen bis zum vollständigen Auflösen des Pulvers. I-Block wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.
<b>Transferpuffer 10X</b>	0,24 M TRIS, 0,2 M Glycine (Roth), dH <sub>2</sub> O ad 5L
<b>Mini-Protean Blotting System (Biorad)</b>	
<b>Filterpapier Whatman</b>	<b>(Schleicher&amp;Schuell)</b>
<b>PVDF Membran</b>	<b>(Millipore)</b>
<b>Horizontalschüttler Typ 3005</b>	<b>(GFL)</b>
<b>ECL-System</b>	<b>(General Electric)</b>
<b>ECL-Plus-System</b>	<b>(General Electric)</b>

Nach Auftrennung der Proteine wurden diese mittels Elektroblothing-Technik auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde das SDS-Gel in einem Sandwich (Schwamm, 2 Lagen Filterpapier, SDS-Gel, Immobilion-P Membran, 2 Lagen Filterpapier, Schwamm) zusammengebaut. Das Sandwich wurde in eine MINI-Protean Transfer-Blot Kammer entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei 400 mV für 65 min. Nach dem Transfer wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen durch 30 minütige Inkubation auf einem

Horizontalschüttler bei Raumtemperatur (RT) und 200 upm mit Block-Milch oder I-Block abgesättigt. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper bei RT (200 upm). Nach zwei 1minütigen Waschschritten bei 200 upm auf einem Horizontalschüttler mit PBS-Tween (s.o.) wurden die Blotmembranen für eine weitere Stunde mit dem Zweitantikörper (siehe unten) bei RT inkubiert. Nach weiteren fünf 5minütigen Waschschritten mit PBS-Tween erfolgte die Detektion der Proteine mit dem ECL-System (GE) entsprechend den Angaben des Herstellers. Im Fall von niedrig exprimierten Proteinen wurde das ECL-Plus-System (GE) verwendet. Die Blots wurden auf Super Rx (Fuji-X-ray medical) Filmen in einem Crurix 60 (Agfa) Entwickler laut Herstellerangabe entwickelt.

### 2.3.14. Zum Western Blot verwendete Antikörper

**Tabelle 20:**

Antikörper	Epitop	Verdünnung	Quelle
Anti-HA	YPYDVPDYA	1:1000 (PBS-T+0,5% BSA)	Maus, monoklonal, (Sigma)
Anti-FLAG M2	DYKDDDDK	1:2000 (PBS-T+0,5% BSA)	Maus, monoklonal, (Sigma)
PS-1 N (Nixon)	PS-1 N-Terminus (AS 2-81)	1:4000 (I-Block)	Maus, monoklonal
1638	Pen-2-N-Terminus (AS 4-15)	1:1000 (I-Block)	Kaninchen, polyklonal (Steiner)
N1660	NCT C-Terminus (AS 693-709)	1:4000 (I-Block)	Kaninchen, polyklonal (Steiner)
Aph-1 433G	Aph-1 C-Terminus (AS 245-265")	1:1000 (I-Block)	Kaninchen, polyklonal (Steiner)
BACE-1 CT	BACE-1 C-Terminus	1:1000 (PBS-T+0,5% BSA)	Kaninchen, polyklonal (ProSci)
BACE-2 CT	BACE-2 C-Terminus	1:1000 (PBS-T+0,5% BSA)	Kaninchen, polyklonal (ProSci)
β-Actin	β-Actin	1:10000 (PBS-T+0,5% BSA)	Maus, monoklonal (Sigma)
22C11	APP-Ektodomäne	1:1000 (PBS-T+0,5% BSA)	Maus, monoklonal (Bayreuther)

Die Zweitantikörper Anti-Kaninchen IgG und Anti-Maus IgG gekoppelt mit HRP (horseradishperoxidase, Mehrrettichperoxidase) wurden von Promega bezogen und in einer Verdünnung von 1:10000 in PBs-T mit 5% BSA oder I-Block (ohne Zugabe von Natriumazid) eingesetzt.

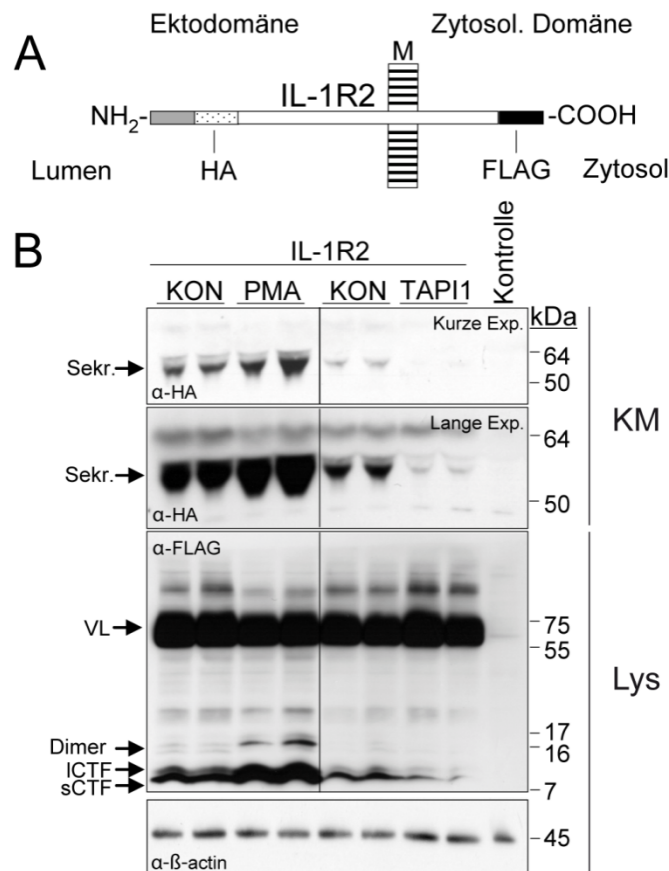
## 3. Ergebnisse

### 3.1. IL-1R2 wird durch eine unbekannte Metalloprotease sekretiert

Viele Typ I-Membranproteine werden durch sogenannte Sekretasen geschnitten und damit in den Extrazellulärraum freigesetzt. Zu diesen Proteinen gehört wie APP auch der Interleukin-1 Rezeptor Typ-2 (IL-1R2) [142]. Um die Prozessierung von IL-1R2 zu studieren, wurden der N-Terminus von IL-1R2 mit einem HA-Epitop und der C-Terminus mit einem FLAG-Epitop gekoppelt, welche beide mit entsprechenden Antikörpern detektiert werden können (*Abb. 11A*). In einem ersten Experiment sollte die Rolle von Metalloproteasen in der Ektodomänenspaltung von IL-1R2 untersucht werden. Dazu wurde IL-1R2 mittels liposomaler Transfektion transient in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-EBNA) exprimiert. Hierbei handelt es sich um aus humanen embryonalen Nieren gewonnene Zellen, welche mit dem Epstein-Barr Virus Kernantigen (EBNA) immortalisiert wurden. Da sie sich sehr einfach transfizieren lassen und hohe Level des gewünschten Transgens exprimieren, wurden alle grundlegenden Experimente mit diesen Zellen durchgeführt. Im konditionierten Medium (KM) von transient mit IL-1R2 transfizierten HEK293-EBNA Zellen konnte mit einem HA-Antikörper eine 55 kDa große Bande detektiert werden, welche mit einem FLAG-Antikörper nicht zu detektieren war (*Abb. 11B, beide oberen Abbildungen, markiert mit Sekr.*). Dies spricht dafür, dass das im Überstand nachzuweisende IL-1R2 nicht mehr seinen ursprünglichen C-Terminus besitzt. Dies ließe sich durch Sekretion der Ektodomäne nach proteolytischer Prozessierung von IL-1R2 in einem etwa 20 Aminosäuren umfassenden Bereich in unmittelbarer Nähe zur Membranoberfläche, der Juxtamembrandomäne, erklären. Im Lysat (*Abb. 11 B/Lys.*) der gleichen Zellen fand sich eine 65 kDa große Bande, die mit beiden Antikörpern detektiert werden konnte. Da N- und C-Terminus nachzuweisen sind, muss es sich hierbei um das proteolytisch nicht prozessierte, Volllängenprotein (VL) von IL-1R2 handeln. Bei geringerer Expositionszeit zeigten sich auf der gleichen Höhe zwei Banden bei 60 und 64 kDa, die höchstwahrscheinlich dem unmaturierten und dem maturierten Volllängenprotein (VL) entsprechen. Dabei handelt es sich im ersten Fall um das noch im endoplasmatischen Retikulum und cis Golgi-Netzwerk sitzende Volllängenprotein, welches noch nicht alle posttranslationalen

Modifikationen durchlaufen hat. Dies ist vor allem die Komplexglykosylierung der drei in der IL-1R2 Ektodomäne vorhandenen N-Glykosylierungsmotive. Im zweiten Fall handelt es sich folglich um das komplex glykosylierte, proteolytisch nicht prozessierte Volllängenprotein, welches aufgrund der zahlreichen Zuckerreste in der SDS-Gelelektrophorese höher läuft. Des Weiteren fanden sich im Lysat kleinere Fragmente von 8, 9 und 16 kDa Größe, die sich nur mit dem FLAG-Antikörper nachweisen ließen und damit den C-terminalen Fragmenten (CTFs) von IL-1R2 entsprechen (*Abb.11B* /sCTF,ICTF). Es handelt sich hierbei um die korrespondierenden Fragmente zur löslichen IL-1R2 Ektodomäne im konditionierten Medium (KM), welche nach Ektodomänenspaltung von IL-1R2 entstehen. Das 8 kDa große Fragment (sCTF) war im Lysat in allen Experimenten abundanter als das 9 kDa große Fragment (ICTF). Im Fall des 16 kDa großen Fragments handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein Dimer, welches vor allem bei größeren Mengen des 8 kDa Fragments präsent war. Transient IL-1R2 exprimierende HEK293-EBNA Zellen wurden in diesem Experiment mit den Substanzen PMA und TAPI-1 behandelt. Bei PMA (Phorbol-12-Myristat-Acetat) handelt es sich um einen Phorbol-ester, welcher über Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) zu einer Aktivierung der  $\alpha$ -Sekretase-Spaltung führt [143]. Nach Behandlung mit PMA zeigte sich ein zwei bis dreifacher Anstieg der sekretierten Ektodomäne von IL-1R2 im Überstand (*Abb.11 B, Sekr.*). Zeitgleich nahmen die nach der Sekretion in der Zellmembran verbleibenden C-terminalen Fragmente von HA-IL-1R2-FLAG zu, während die Menge des maturierten, unprozessierten Volllängenproteins (VL) abnahm. Im Fall von TAPI-1 (TNF $\alpha$ -Protease-Inhibitor-1) handelt es sich um einen Metalloproteaseinhibitor mit unterschiedlicher Affinität gegenüber den einzelnen Mitgliedern der ADAM- (A Disintegrin and Metalloprotease) und Matrixmetalloproteasefamilie (MMP) [144, 145]. Die Behandlung der Zellen mit TAPI-1 führte im Überstand (KM) zu einer deutlichen Abnahme der sekretierten Ektodomäne. Des Weiteren nahm die Menge der membranständigen C-terminalen Fragmente im Lysat ab, während die Menge an maturiertem Volllängenprotein (VL) im Lysat zunahm. Ein weiterer Western-Blot für  $\beta$ -Aktin diente jeweils als Ladekontrolle für die einzelnen Spuren, um zu zeigen, dass gleiche Mengen an Protein auf jede Spur aufgetragen wurden (*Abb.11B, untere Abbildung*). Da die IL-1R2 Ektodomänenspaltung durch PMA stimuliert und durch den Metalloproteaseinhibitor TAPI-1 gehemmt werden, gab dieses Experiment somit einen ersten Hinweis darauf, dass die Ektodomänenspaltung von IL-1R2 durch eine

Metalloprotease vermittelt wird [146]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass weder HA- noch FLAG-Epitop einen Einfluss auf die Prozessierung von IL-1R2 haben.



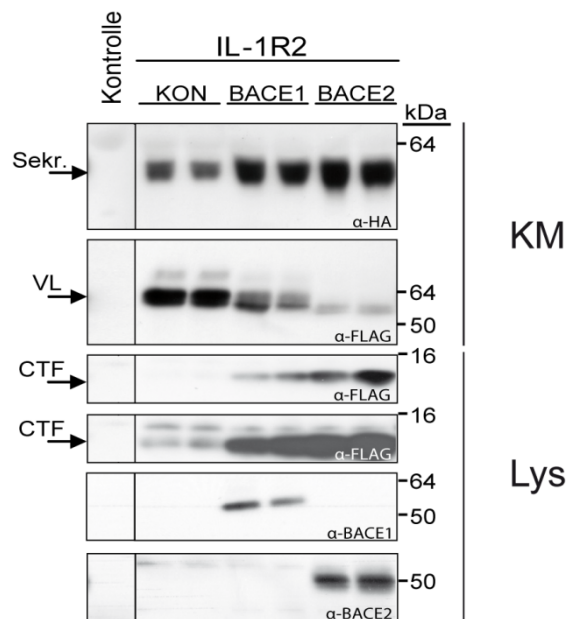
**Abbildung 11: IL-1R2 wird Metalloprotease-abhängig geschnitten und damit sekretiert**

**A**, Schematische Zeichnung des Epitop konjugierten IL-1R2, welches aus dem CD5-Signalpeptid (grau), gefolgt von einem HA-Epitop (gepunktet), der IL-1R2 kodierenden Sequenz ohne Signalpeptid (offene Box) und einem C-terminalen FLAG Epitop (schwarz) besteht. N- und C-Terminus wie auch die luminale und die zytosolische Domäne sind beschrieben. M, Membran **B**, HEK293 Zellen wurden transient entweder mit leerem Kontrollvektor (KON) oder HA-IL-1R2-FLAG transfiziert. Alle Experimente bis auf die Kontrolle wurden doppelt ausgeführt. Für die Stimulation der Ektodomänenspaltung wurden die Zellen entweder 4h mit Ethanol als Lösungsmittelkontrolle oder mit PMA stimuliert. Für die Inhibition der Sekretion von HA-IL-1R2-FLAG wurden die Zellen 45 min mit Me<sub>2</sub>SO als Lösungsmittelkontrolle oder mit dem Metalloproteaseinhibitor TAPI-1 (25µM) vorbehandelt, um anschließend nochmals für 4h Stunden mit Me<sub>2</sub>SO oder TAPI-1 weiterbehandelt zu werden. Die oberen beiden Abbildungen zeigen unterschiedliche Expositionszeiten des gleichen Western-Blots, welcher die sekretierte IL-1R2 Ektodomäne (**Skr.**) im Überstand (KM) zeigt. In der unteren Abbildung wurde das Vollängenprotein (**VL**), ein langes (**ICTF**) und ein kurzes CTF (**sCTF**) und ein Dimer des kurzen CTF (**Dimer**) mit dem anti-FLAG-M2 Antikörper im Zelllysat (**Lys**) nachgewiesen. Als Kontrolle wurde β-Actin detektiert, um einen Einfluß der Substanzen auf die Gesamteproteinkonzentration der Zelle auszuschließen. Der β-Actin-Blot ist von einem anderen aber gleich durchgeführten Experiment. Es werden repräsentative Abbildungen von drei unabhängig durchgeführten Experimenten gezeigt.



### 3.2. IL-1R2 kann durch die $\beta$ -Sekretase BACE1 und ihr Homolog BACE2 geschnitten werden

APP wird in seiner Ektodomäne proteolytisch durch  $\alpha$ -Sekretasen und zu einem kleineren Anteil durch die vor allem im Gehirn exprimierte  $\beta$ -Sekretase BACE1 gespalten [45, 46]. Da IL-1R2, ähnlich wie auch APP durch  $\alpha$ -Sekretasen geschnitten wird, lag es nahe, IL-1R2 hinsichtlich seiner Spaltbarkeit durch die  $\beta$ -Sekretase zu untersuchen. Dafür wurden HEK293-EBNA mit IL-1R2, leerem Kontrollvektor oder BACE1, oder BACE2 kotransfiziert. Im Vergleich zu den mit Kontrollvektor kotransfizierten HEK293-EBNA Zellen fand sich im Überstand der mit BACE1 und BACE2 kotransfizierten Zellen eine deutliche Zunahme der sekretierten Ektodomäne von IL-1R2 (*Abb.12  $\alpha$ -HA*). Gleichzeitig fand sich im Lysat eine deutliche Abnahme des maturierten Volllängenproteins, während die C-terminalen Fragmente deutlich zunahmen. Die Größe der C-terminalen Fragmente (CTFs) entsprach dabei den unter endogenen Bedingungen gebildeten CTFs von IL-1R2 (*Abb.12,  $\alpha$ -FLAG*). Die Menge der C-terminalen Fragmente war unter Koexpression von BACE2 deutlich stärker erhöht als unter Koexpression von BACE1. Gleichzeitig war nur eine leichte zusätzliche Zunahme der IL-1R2 Ektodomänenspaltung zwischen BACE1 und BACE2 festzustellen. Die Größe der durch stimulierte  $\alpha$ -Spaltung (*Abb.11/PMA*) und  $\beta$ -Spaltung (BACE1/2) erzeugten C-terminalen Fragmente liefen im Western-Blot auf der gleichen Höhe, was darauf schließen lässt, dass  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase von IL-1R2 entweder an der gleichen Peptidbindung oder sehr nah beieinander schneiden. Die Zunahme der Spaltung von IL-1R2 unter Überexpression von BACE1 und BACE2 in diesem Experiment war ein erstes Indiz dafür, dass es sich bei IL-1R2 um ein neues BACE-Substrat handeln könnte.

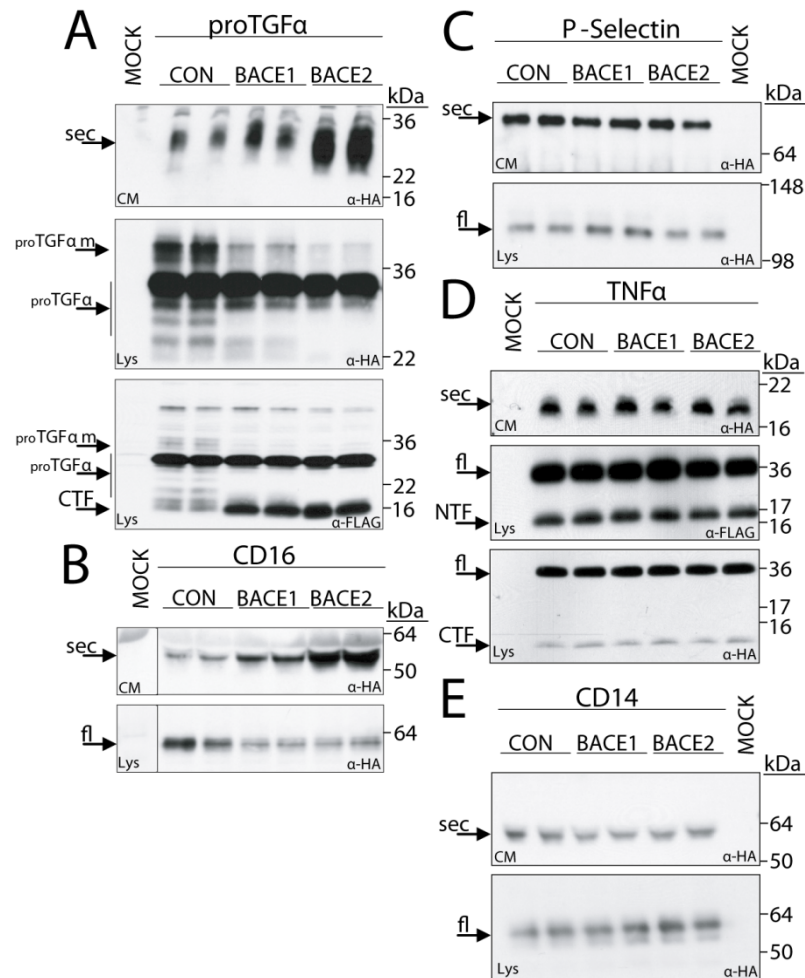


**Abbildung 12: IL-1R2 kann durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 und ihr Homolog BACE2 geschnitten werden** Im Überstand (KM) wurde die sekretierte IL-1R2 Ektodomäne (Sokr.) mit einem HA-Antikörper nachgewiesen. Im Lysat (Lys) wurden das IL-1R2 Vollängenprotein (VL) und die C-terminalen Fragmente (CTF) mit einem FLAG-Antikörper nachgewiesen. Des Weiteren wurde zur Kontrolle auf BACE1 und 2 geblottet. Es zeigt sich eine Zunahme der sekretierten Ektodomäne und der c-terminalen Fragmente nach Überexpression von BACE1 und 2. Dargestellt sind repräsentative Western-Blots von 4 unabhängigen Experimenten.

### 3.3. Westernblot Analyse des Einflusses von BACE1 und 2 auf die Sekretion von Epitop - gekoppelten Proteinen

Um auszuschließen, dass durch Überexpression von BACE1 und 2 unspezifisch jedes Membranprotein geschnitten werden kann, wurden neben IL-1R2 weitere Membranproteine auf ihre Prozessierung durch BACE1 und BACE2 untersucht. Dazu wurde die Ektodomäne von allen zu untersuchenden Proteinen mit einem HA-Epitop (YPYDVPDYA) und das Ende der zytoplasmatischen Domäne mit einem FLAG-Epitop (DYKDDDDK) versehen. Dies erlaubte es, mit den sehr gut charakterisierten Antikörpern Anti-HA und Anti-FLAG die Epitop konjugierten Proteine im Western-Blot nachzuweisen. Alle Proteine wurden zusammen mit dem leeren Kontrollvektor P12-Linker, P12-BACE1 oder P12-BACE2 in HEK293-EBNA Zellen kotransfiziert. Bei Überexpression von BACE1 und BACE2 nahm die Sekretion von HA-TGF $\alpha$ -FLAG und HA-CD16 deutlich zu (Abb. 13 A/B). Dies ließ

darauf schließen, dass es sich bei TGF $\alpha$  und CD16 um neue Substrate handeln könnte.

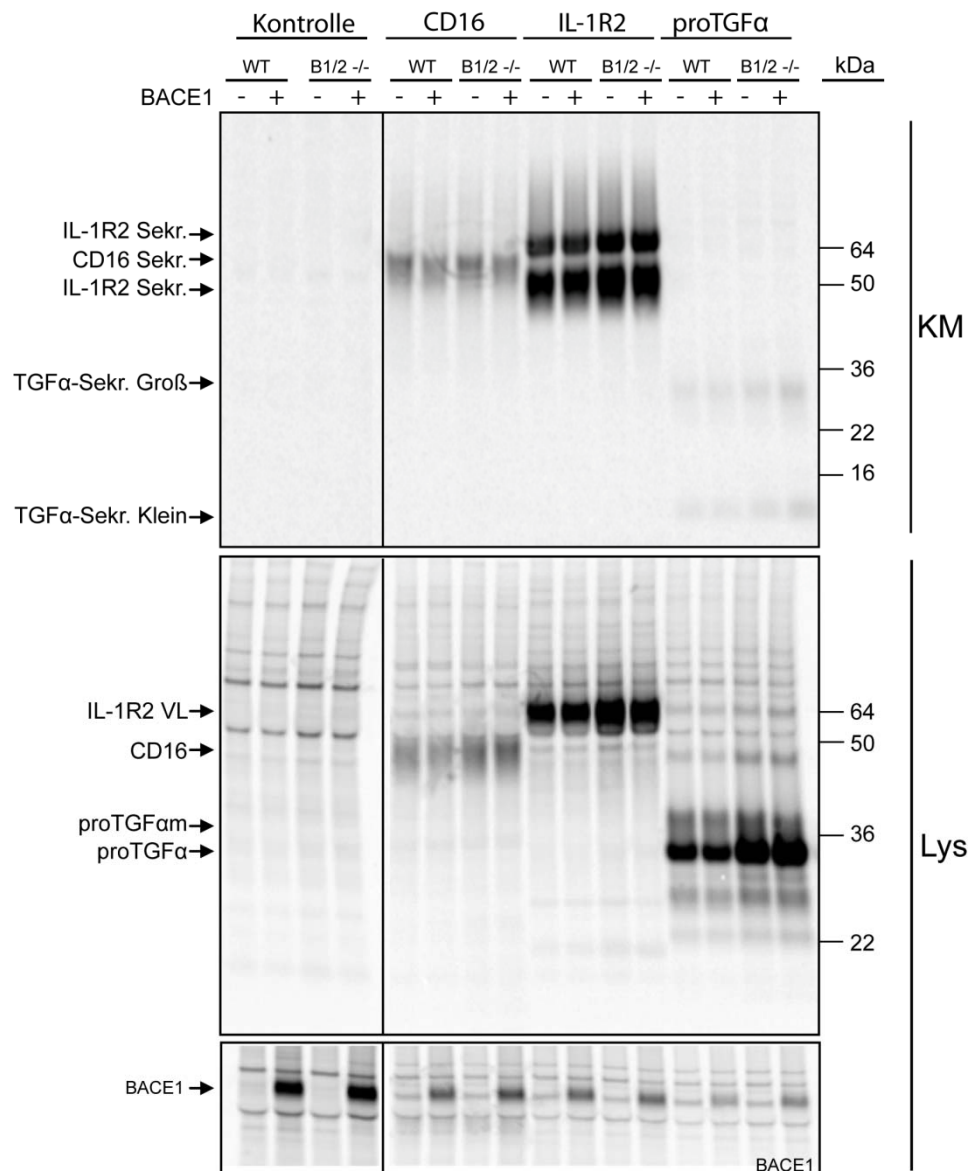


**Abb.13 Expression von BACE1 und BACE2 stimuliert die Sekretion von TGF  $\alpha$  und CD16.** HEK293 Zellen wurden transient mit leerem Kontrollvektor oder den Epitop konjugierten Konstrukten pro-TGF $\alpha$  (A), CD16 (B), P-Selectin (C), TNF $\alpha$  (D) und CD14 (E) transfiziert. Darüber hinaus wurden die Zellen entweder mit leerem Vektor oder mit BACE1 oder mit BACE2 kotransfiziert. Der Überstand und die Lysate wurden mittels Gelelektrophorese getrennt und anschließend mit den angezeigten Antikörpern detektiert. Hier sind representative Blots von mehr als 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. **A** Erkennbar ist eine Zunahme von sekretiertem TGF $\alpha$  (**Sek.**) bei Koexpression von BACE1 und 2 im Überstand (KM). Gleichzeitig nimmt die mature Form von proTGF $\alpha$  (**proTGF $\alpha$ m**), detektiert mit  $\alpha$ -HA und  $\alpha$ -FLAG, im Lysat (**Lys**) ab. **B** Nach Überexpression von BACE1 und 2 nimmt die mit  $\alpha$ -HA detektierbare, sekretierte Form von CD16 (**Sek.**) deutlich zu, während das im Zelllysat mit  $\alpha$ -HA nachweisbare mature Volllängenprotein von CD16 deutlich abnimmt. **C** P-Selectin zeigte nach Überexpression von BACE1 und 2 weder eine Zunahme der Sekretion (Sek.) noch eine Abnahme des maturen Volllängenproteins (VL) im Lysat. **D** Für das Typ II Membranprotein konnte ebenfalls kein Effekt auf die Sekretion nach BACE1 und 2 Überexpression festgestellt werden. **E** Auch für CD14 war kein Effekt von BACE1 und 2 auf die Sekretion erkennbar. Senkrechte Linien im Blot bedeuten, dass die Proben auf dem gleichen Gel, jedoch nicht direkt nebeneinander liefen.

Gleichzeitig nahm die Sekretion von FLAG-TNF $\alpha$ -HA, HA-CD14 und HA-P-Selectin nicht zu, was bedeutet, dass es sich bei diesen Proteinen eher um keine Substrate für BACE1 und BACE2 handeln kann (*Abb. 13 C/D/E*). Dabei zeigte die Koexpression von BACE2 einen stärkeren Effekt auf die Sekretion der Ektodomänen von TGF $\alpha$  und CD16 als BACE1. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass BACE1 und BACE2 vermutlich mehrere Substrate haben, aber beide eine klare Spezifität besitzen, da beide nicht zur verstärkten Sekretion aller untersuchten Membranproteine führten. Dies könnte im Fall von FLAG-TNF $\alpha$ -HA, HA-CD14 und HA-P-Selectin durch eine sich von BACE unterscheidende Sortierung oder aufgrund einer nicht für die Substrattasche von BACE geeigneten Tertiärstruktur dieser Proteine bedingt sein.

### **3.4. Der Knockout von BACE1 und BACE2 in primären Maus Neuronen führt zu keiner Verringerung der Gesamtsekretion von IL-1R2, TGF $\alpha$ und CD16**

Nachdem für IL-1R2 gezeigt werden konnte, dass es nach Überexpression von BACE1 und 2 vermehrt geschnitten werden kann, sollte untersucht werden, ob IL-1R2 auch durch endogenes BACE1 prozessiert werden kann. Dazu wurden in einem Kollaborationsprojekt mit Bart de Stroopers Labor in Leuven, aus Wildtyp- und BACE1 und 2 Doppelknockout Mäusen isolierte primäre kortikale Neuronen viral mit IL-1R2, transduziert. Zusätzlich wurden auch die beiden anderen Kandidaten TGF $\alpha$  und CD16 hinsichtlich ihrer Prozessierung durch BACE1 und 2 untersucht. Die im Überstand (KM) und Zelllysate (Lys) vorhandenen, radioaktiv markierten Proteine wurden mittels Immunpräzipitation gereinigt und im Western Blot analysiert. Sollten BACE1 oder BACE2 einen essentiellen Teil zur Ektodomänenspaltung von IL-1R2 beitragen, so müsste die Gesamtsekretion von IL-1R2 in BACE1/2 Knockout Neuronen gegenüber Wildtyp-Neuronen vermindert sein und die Menge an maturem Volllängenprotein aufgrund der verringerten Spaltung zunehmen. Für alle drei Proteine konnte im Vergleich zu den Wildtyp-Neuronen jedoch keine Abnahme der sekretierten Ektodomäne (IL-1R2 Sekr., CD16 Sekr., TGF $\alpha$ -Sokr. Klein/Groß) im Überstand der BACE1/2 Doppelknockout-Neuronen festgestellt werden (*siehe Abb.14 KM*).



**Abbildung 14: Vergleich der Ektodomänensekretion von IL-1R2, TGFα und CD16 zwischen Wildtyp und BACE1/2 Knockout Neuronen.** Primäre kortikale Wildtyp (WT) oder BACE1 und 2 Knockout (B1/2 -/-) Neuronen wurden mit IL-1R2, TGFα und CD16 transduziert. Die mit radioaktiven Aminosäuren markierten Proteine wurden aus dem Zelllysate (**Lys**) und dem konditionierten Medium (**KM**) immunpräzipitiert und anschließend analysiert. Zwischen Wildtyp und Knockout konnte kein Unterschied für die Mengen der sekretierten Ektodomänen von IL-1R2 (**IL-1R2 Sekr.**), TGFα (**TGFα-Sekr.**) und CD16 (**CD16 Sekr.**) beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte die zusätzliche Expression von BACE1 keinen Effekt auf die Sekretion aller drei Proteine.

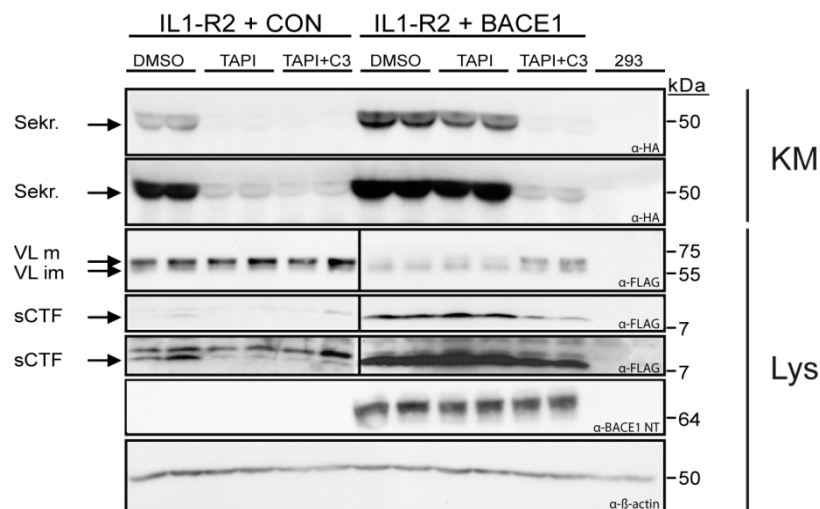
Darüber hinaus zeigte sich auch keine Zunahme der Vollängenproteine (IL-1R2VL, CD16, proTGFαm) im Lysat der BACE1 und 2 Doppelknockoutneuronen im Vergleich zu den Wildtyp-Neuronen (siehe Abb.14 Lys). Des Weiteren konnte keine

Zunahme der Sekretion von IL-1R2, TGF $\alpha$  und CD16 nach Überexpression von BACE1 im Überstand von Wildtyp und Knockout Neuronen beobachtet werden. Dies könnte dafür sprechen, dass BACE1 und BACE2 unter endogenen Bedingungen wie auch bei APP nur eine untergeordnete Rolle in der Ektodomänenspaltung von IL-1R2, TGF $\alpha$  und CD16 spielen. So lässt sich auch bei APP keine Aussage über die Aktivität von BACE1 und 2 anhand der Gesamtsekretion treffen, da APP zu weniger als 5 % durch BACE1 geschnitten wird und somit ein Fehlen von BACE1 und BACE2 für die Gesamtsekretion kaum ins Gewicht fällt. Darüber hinaus kommt es im Fall eines BACE1 und 2 Doppelknockout zu einer vermehrten Prozessierung durch  $\alpha$ -Sekretasen, welche den Verlust der  $\beta$ -Spaltung kompensiert. Im Fall von APP lassen sich  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase-Aktivität jedoch voneinander unterscheiden, da die Schnittstellen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase im Fall von APP so weit voneinander entfernt liegen, dass die resultierenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -C-terminalen Fragmente sich in der SDS-Gelelektrophorese voneinander trennen lassen. Hingegen konnten die  $\alpha$ - und  $\beta$ -geschnittenen C-terminalen Fragmente von IL-1R2 und TGF $\alpha$  nicht voneinander getrennt werden. Bei dem GPI-verankerten Protein CD16 entstehen überhaupt keine C-terminalen Fragmente, was es in diesem Fall sehr schwierig macht, zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Schnitt zu unterscheiden. Somit ist es schwierig, aus diesem Experiment eine endgültige Schlussfolgerung, ob es sich bei IL-1R2, TGF $\alpha$  und CD16 um physiologische Substrate von BACE1 und 2 handelt oder nicht, zu ziehen

### 3.5. Selektive Hemmung der $\alpha$ - und $\beta$ -Spaltung von IL-1R2

In einem ersten Experiment konnte gezeigt werden, dass es bei Koexpression von IL-1R2 und BACE1 oder BACE2 zu einer vermehrten Prozessierung und Sekretion von IL-1R2 kommt (s. Abb.12). Dies kann zum einen durch einen direkten Schnitt von BACE1 oder BACE2 in der Juxtamembrandomäne von IL-1R2 stattfinden. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass BACE1 und BACE2 die Sekretion von IL-1R2 indirekt über Aktivierung anderer Proteasen stimulieren. Damit diese Möglichkeit ausgeschlossen werden konnte, wurden in einem weiteren Experiment HA-IL-1R2-FLAG mit leerem Kontrollvektor oder BACE1 in HEK293EBNA Zellen koexprimiert. Im Fall einer Aktivierung anderer Metalloproteasen durch BACE1 sollte sich diese Zunahme mit einem Metalloproteaseinhibitor wie z.B. TAPI-1 effizient hemmen lassen. Bei einer direkten

Prozessierung von IL-1R2 durch BACE1 sollte TAPI-1 bis auf den weiterhin durch Metalloproteasen vermittelten Anteil nicht in der Lage sein die Ektodomänenspaltung zu hemmen. Hingegen sollte bei zusätzlicher Behandlung der Zellen mit dem BACE-Inhibitor C3 eine deutliche Abnahme der Sekretion zu sehen sein. Am zweiten Tag nach Transfektion wurden die Zellen entweder mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, mit TAPI-1 oder mit einer Kombination aus TAPI-1 und dem BACE spezifischen Inhibitor C3 [138] für 45min vorbehandelt und nach einem Mediumwechsel für 4h unter gleichen Bedingungen weiterbehandelt. Nach Inkubation der mit leerem Kontrollvektor und IL-1R2 transfizierten Zellen, konnte eine deutliche Abnahme der Sekretion der IL-1R2 Ektodomäne beobachtet werden.



**Abbildung 15: BACE1 induzierte Sekretion von IL-1R2 kann nur effektiv durch C3 inhibiert werden** HEK293E Zellen wurden transfiziert wie in Abbildung 11. Am 2. Tag nach Transfektion wurden die Zellen entweder mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, TAPI-1 oder der Kombination aus TAPI-1 und C3 behandelt. Es werden jeweils 2 Expositionszeiten des Überstandes und der Zelllysate gezeigt. Dabei werden Ausschnitte des Western-Blots des Volllängenproteins von IL-1R2 gezeigt, welches sich als eine mature (**IL-1R2m**) und eine immature Bande (**IL-1R2im**) darstellt. Desweiteren werden Ausschnitte des Western-Blots der C-terminalen Fragmente von IL-1R2 gezeigt (sCTF). Zur Kontrolle wurde die Expression von BACE1 mittels eines N-terminalen BACE1 Antikörpers (**α-BACE1 NT**) nachgewiesen. Darüber hinaus wurde als Ladekontrolle auf β-Actin geblottet (**α-β-Actin**). Während die Sekretion von IL-1R2 in IL-1R2 und leerem Kontrollvektor kotransfizierten Zellen (**IL-1R2 + KON**) mit TAPI-1 (**TAPI**) deutlich gehemmt werden kann, wird sie in mit IL-1R2 und BACE1 kotransfizierten Zellen (**IL-1R2 + BACE1**) nur mit einer Kombination aus TAPI1 und C3 effektiv gehemmt (**TAPI+C3**).

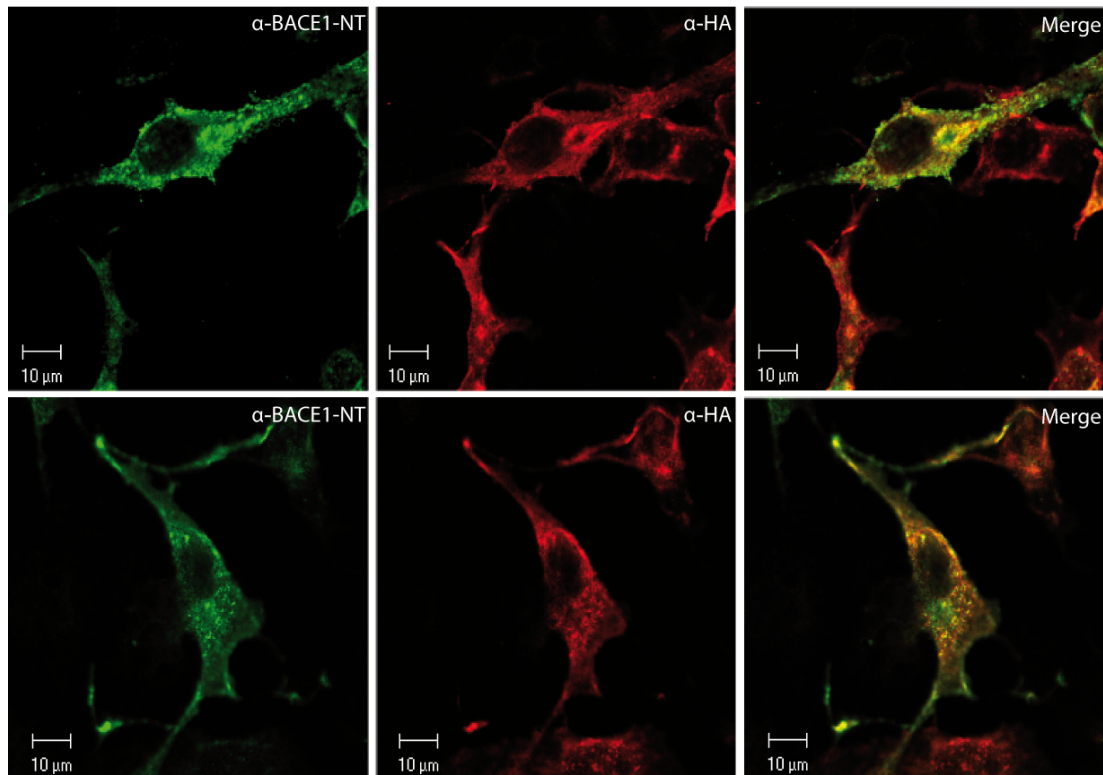
Diese konnte durch die Kombination von TAPI-1 und C3 nicht deutlich zusätzlich gesenkt werden (*Abb.15, α-HA*). Im Vergleich dazu bewirkte der Metalloprotease-

Inhibitor TAPI-1 nur eine milde Abnahme der Sekretion von IL-1R2 in HEK293-EBNA Zellen, welche mit IL-1R2 und BACE1 kotransfiziert waren. Jedoch bewirkte die Kombination von TAPI-1 und C3 eine deutliche Abnahme der Sekretion der IL-1R2 Ektodomäne im Überstand im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen. Zeitgleich mit der Abnahme der Sekretion im Überstand der mit IL-1R2 und BACE1 kotransfizierten Zellen fand sich eine deutliche Akkumulation des maturen Volllängenproteins von IL-1R2 im Lysat, welches marginal nach Zugabe von TAPI-1 und deutlich nach Zugabe der Kombination von TAPI-1 und C3 zunahm (*Abb. 15,  $\alpha$ -Flag, Lys*). Die nur schwache Abnahme der Ektodomänenspaltung von IL-1R2 nach Behandlung mit dem Metalloproteaseinhibitor TAPI-1 in den BACE1 überexprimierenden Zellen lässt darauf schließen, dass es zu keiner indirekten Aktivierung von Metalloproteasen aus der ADAM- und MMP-Familie durch BACE1 Überexpression kommt, so dass man davon ausgehen kann, dass BACE1 in der Lage ist, IL-1R2 direkt zu schneiden.

### 3.6. Kolokalisierung von HA-IL-1R2-FLAG und BACE1

Damit eine Protease ein mögliches Substrat schneiden kann, müssen sich Protease und Substrat im gleichen Kompartiment zur gleichen Zeit aufhalten. Ein weiteres Kontrollexperiment sollte zeigen, dass BACE1 und IL-1R2 in der indirekten Immunfluoreszenz eine ähnliche Lokalisation in der Zelle haben und somit BACE1 in der Lage ist, IL-1R2 zu schneiden. Dafür wurden HA-IL-1R2-FLAG und BACE1 in transformierten afrikanischen Affennierenzellen (COS-7) koexprimiert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen entsprechend dem Protokoll (siehe 2.3.2) mit Antikörpern gegen die BACE1 Ektodomäne und den HA-tag von HA-IL-1R2-FLAG gefärbt, um anschließend mit einem polyklonalen Alexa488-Antikörper und einem monoklonalen Alexa594-Antikörper gefärbt zu werden. Die Zellen wurden unter einem konfokalen Mikroskop (Zeiss) beurteilt und fotodokumentiert. Das überlagerte Bild beider Kanäle zeigte eine deutliche Kolokalisierung von HA-IL-1R2-FLAG und BACE1 an der Plasmamembran und in vesikulären und perinukleären Kompartimenten, was dafür spricht, dass BACE1 und IL-1R2 prinzipiell in der Lage sind, miteinander zu interagieren.





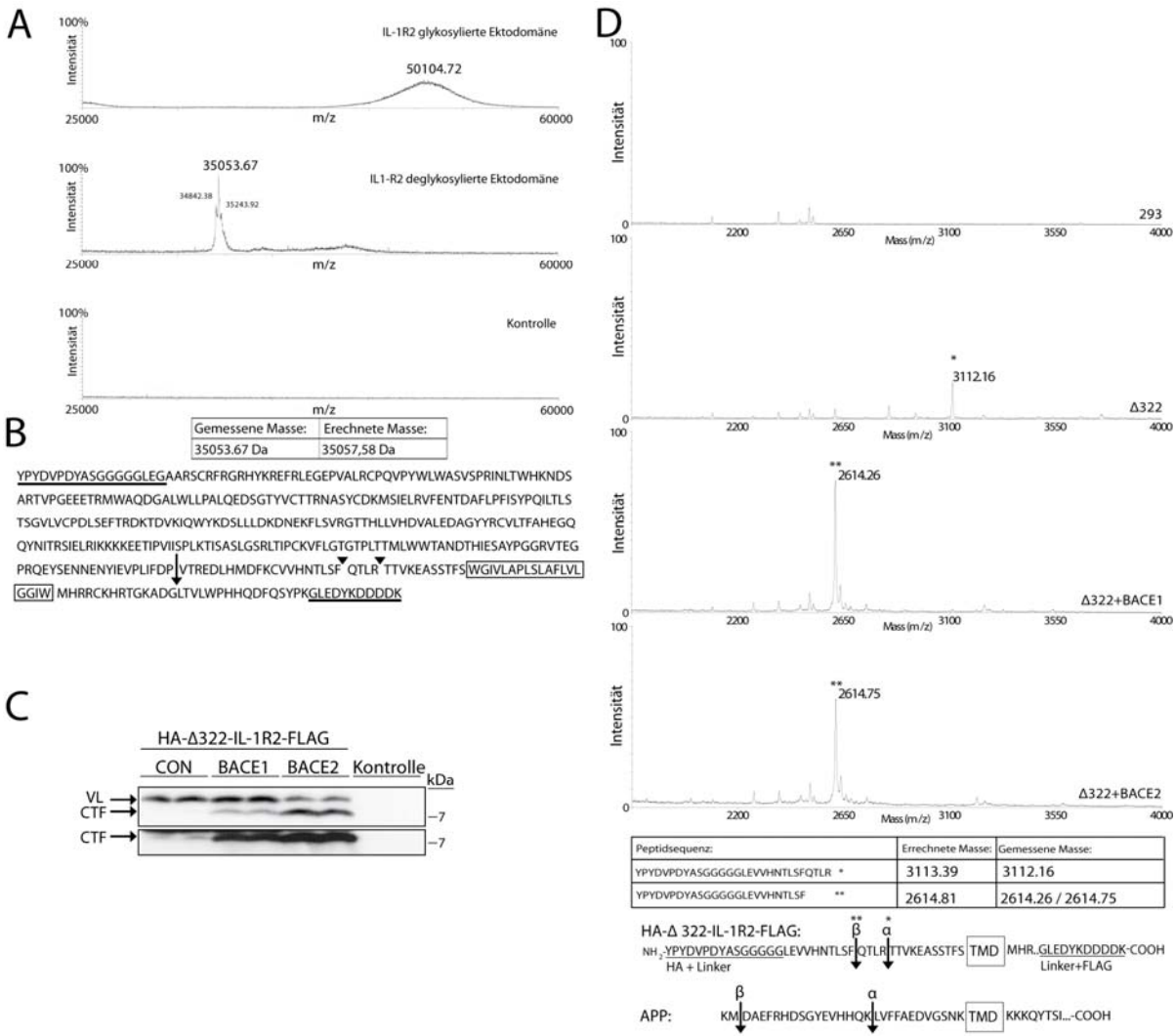
**Abbildung 16:** In der Immunfluoreszenz weisen HA-IL-1R2-FLAG und BACE1 eine ähnliche Lokalisation in der Zelle auf. COS Zellen wurden transient mit IL-1R2 und BACE1 transfiziert. Am darauffolgenden Tag wurden in einer Immunfärbung BACE1 (Grün,  $\alpha$ -BACE1-NT) und IL-1R2 (Rot,  $\alpha$ -HA) nachgewiesen. Konfokale Mikroskopbilder zeigen eine Kolokalisation von BACE1 und IL-1R2 an der Plasmamembran, in Vesikeln und perinukleär (Merge).

### 3.7. Massenspektrometrische Analyse der $\alpha$ - und $\beta$ -Schnittstelle der IL-1R2 Ektodomäne

Da die beiden durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase erzeugten C-terminalen Fragmente von IL-1R2 im Blot augenscheinlich gleich groß sind (*siehe Abb. 12*), was eine Differenzierung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase-Schnitt deutlich erschwert, wurde versucht, die Schnittstellen der  $\alpha$ -Sekretase Aktivität und von BACE1 und 2 mittels Massenspektrometrie zu bestimmen. Dafür wurden zwei Ansätze verfolgt. In einem ersten Experiment wurde die sekretierte Ektodomäne von HA-IL-1R2-FLAG aus dem Überstand von HEK293E Zellen aufgereinigt, welche entweder mit PMA behandelt wurden oder BACE1 koexprimierten. Anschließend wurde diese mit N-Glykosidase-F deglykolysiert, um sie anschließend in einem MALDI-TOF-Massenspektrometer zu messen. Im Massenspektrum fand sich ein deutlicher Peak bei 35053.67 Da, welcher

4 Da von der errechneten Masse von 35057.58 Da abwich und sich nicht im Überstand mit leerem Vektor transfizierter HEK293E Zellen fand. Die ohne N-Glykosidase-F behandelte IL-1R2 Ektodomäne wurde aufgrund der heterogenen Glykosylierung als ein breiter Peak im Massenspektrum mit einem Scheitelpunkt bei 50 kDa detektiert (*Abb.17A*). Sofern keine weiteren posttranslationalen Modifikationen an der Ektodomäne von IL-1R2 vorliegen, endet die Ektodomäne mit Prolin 309, 35 Aminosäuren von der Transmembrandomäne entfernt (*Abb.17B*). Damit schien der postulierte C-Terminus der sekretierten Ektodomäne zu weit von der Transmembrandomäne entfernt zu sein, um als Schnittstelle in Frage zu kommen. Darüber hinaus unterschied sich der C-Terminus nicht zwischen PMA behandelten oder BACE1 überexprimierenden Zellen. Da gezeigt werden konnte, dass der Austausch der Juxtamembrandomäne von IL-1R2 gegen die Juxtamembrandomäne des Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptors die Sekretion von IL-1R2 verhindert, wurde angenommen, dass IL-1R2 in der Nähe der Transmembrandomäne geschnitten werden kann. Die mit einem Prolin endende sekretierte Ektodomäne von IL-1R2 ließ darauf schließen, dass die sekretierte Ektodomäne sukzessive durch Carboxypeptidasen abgebaut wird, welche nicht in der Lage sind, Proline vom C-Terminus abzuspalten. Mit der Deletionsmutante HA- $\Delta$ 322-IL-1R2-FLAG, welche vor dem ersten Cystein der dritten Ig-Domäne von IL-1R2 endet, sollte gezeigt werden, dass IL-1R2 in der Juxtamembrandomäne durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase prozessiert werden kann. Diese ist damit so kurz, dass eine Trennung der Peptide im MALDI-Massenspektrometer möglich wird, da störende posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen fehlen. Für das Experiment wurde das Deletionskonstrukt mit leerem Vektor, BACE1 oder BACE2 koexprimiert. Die Lysate wurden in einem Experiment mittels Western Blot analysiert, um zu zeigen, dass das Deletionskonstrukt trotz fehlender Ektodomäne weiterhin durch BACE1 und BACE2 geschnitten werden kann (*Abb.17C*). Für die massenspektrometrische Bestimmung wurden die Zellen zusätzlich mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT inkubiert, da dieses Deletionskonstrukt aufgrund der sehr kleinen extrazellulären Domäne auch durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex geschnitten werden kann (*Abb.17D*). Die in den Überstand sekretierten Peptide wurden mittels einer Immunpräzipitation mit HA-Agarose aufgereinigt, um anschließend nach Elution mit  $\alpha$ -Zimtsäure-Matrix mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer gemessen zu

werden. Bei Koexpression von CD5-HA-Δ322-IL-1R2-FLAG und leerem Kontrollvektor fand sich eine Hauptmasse bei 3112,16 Da.

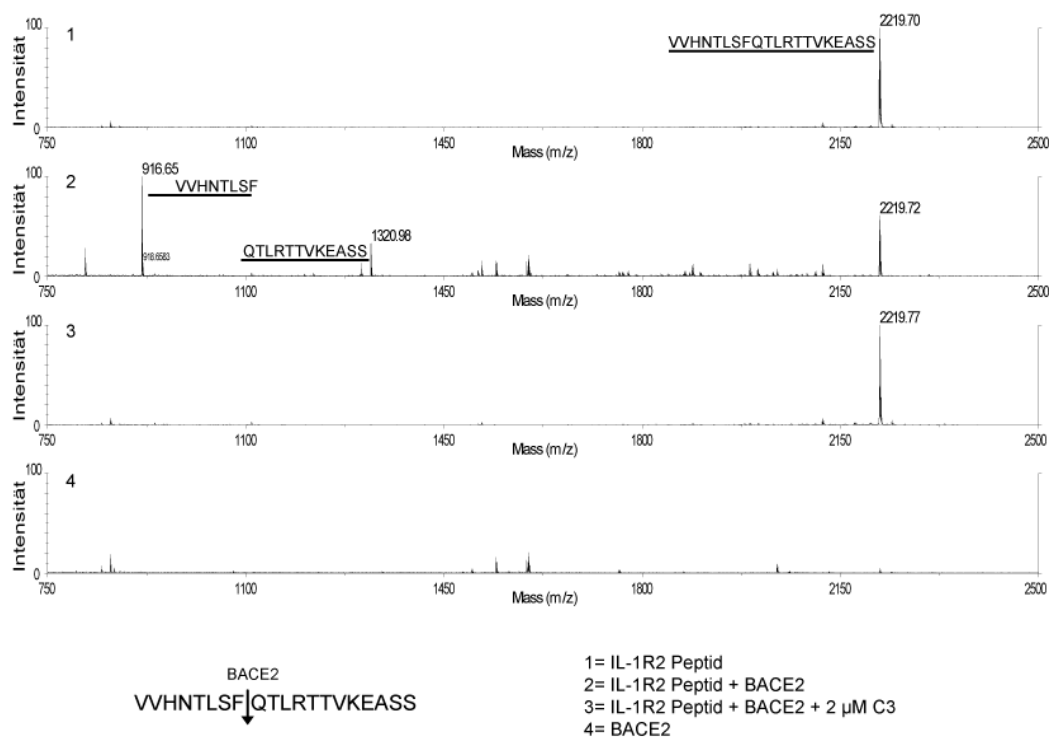


**Abbildung 17: A** Massenspektrometrische Bestimmung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Schnittstelle von IL-1R2. **B** Sequenz von IL-1R2. HA und FLAG Epitop sind schwarz unterstrichen. Der Pfeil zeigt den mutmaßlichen C-Terminus der sekretierten Ektodomäne an. Die Pfeilköpfe zeigen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Schnittstelle. **C** Kontrollexperiment des Deletionskonstruktes. Kotransfektion von HA-Δ322-IL-1R2-FLAG mit leerem Vektor (**CON**), BACE1 oder BACE2, als weitere Kontrolle wurden Lysate nicht transfizierter Zellen aufgetragen (**Kontrolle**). Beide Blots wurden mit dem FLAG Antikörper entwickelt. Man erkennt eine deutliche Zunahme der C-terminalen Fragmente (**CTF**) nach Expression von BACE1 und BACE2, während die Menge des Volllängenproteins (**VL**) abnimmt. **D** Massenspektren der durch BACE1 und -2 sekretierten Peptide des Deletionskonstruktes HA-Δ322-IL-1R2-FLAG. Darunter die Tabelle mit den errechneten und den gemessenen Massen von  $\alpha$ - (\*) und  $\beta$ -geschnittenem HA-Δ322-IL-1R2-FLAG (\*\*) und die entsprechenden Schnittstellen in einer schematischen Gegenüberstellung der Juxtamembrandomänen von HA-Δ322-IL-1R2-FLAG und APP.

Dies entspricht einer Schnittstelle zwischen Arg-333 und Thr-334, welche in mit leerem Kontrollvektor transfizierten Zellen nicht auftrat. Bei Koexpression von BACE1 oder BACE2 zeigte sich ein deutliches Signal bei 2614.26 bzw. 2614.75 Da. Dies entspricht einer Schnittstelle zwischen Phe-329 und Gln-330, welche damit 4 Aminosäuren weiter als die  $\alpha$ -Schnittstelle von der Zellmembran entfernt ist. Dieses Experiment zeigt, dass BACE1, 2 und die unbekannte  $\alpha$ -Sekretaseaktivität innerhalb der Juxtamembrandomäne an unterschiedlichen Schnittstellen schneiden. Sie schneiden jedoch so nah beieinander, dass die resultierenden C-terminalen Fragmente sich in der SDS-Gelelektrophorese nicht auftrennen lassen (Abb. 12/17C).

### 3.8. BACE-2 in-Vitro Peptidverdau von einem IL-1R2-Juxtamembranpeptid

Ein weiteres Indiz für die direkte Prozessierung von IL-1R2 durch BACE1 und BACE2 ist die Umsetzung eines synthetischen Peptids der Juxtamembrandomäne von IL-1R2, welches die *in vivo* bestimmte Schnittstelle enthält. Dafür wurde das IL-1R2 Peptid, welches die Aminosäuren Val-322 bis Ser-341 von IL-1R2 umfasst, über Nacht in einem sauren Acetatpuffer mit gereinigtem, rekombinanten BACE2-Ig Fusionsprotein inkubiert. Das inkubierte Peptidgemisch wurde anschließend mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer im Reflektormodus gemessen. Ohne Zugabe von BACE2-Ig kam es zu keiner Degradation des IL-1R2-Peptids mit der Masse 2219.70 Da (Abb. 18,1). Nach Zugabe von BACE2-Ig jedoch wurde das Volllängenpeptid in 2 kleinere Peptidspezies von 916.65 und 1320.98 Da umgesetzt, deren Massen in der Summe wieder die Masse des Volllängenpeptids ergeben (Abb. 18,2). Dies entspricht einer Schnittstelle zwischen Phe-329 und Gln-330 und damit der schon *in vivo* gemessenen Schnittstelle. Dieser proteolytische Verdau konnte durch Zugabe von 1  $\mu$ M des BACE1/BACE2-Inhibitors C3 verhindert werden (Abb. 18,3). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass rekombinantes BACE2 ohne Zugabe anderer zellulärer Komponenten, in der Lage ist, an der *in vivo* bestimmten Schnittstelle von IL-1R2 zu schneiden, was wiederum dafür spricht, dass BACE1 und BACE2 IL-1R2 in der Zelle direkt schneiden können.



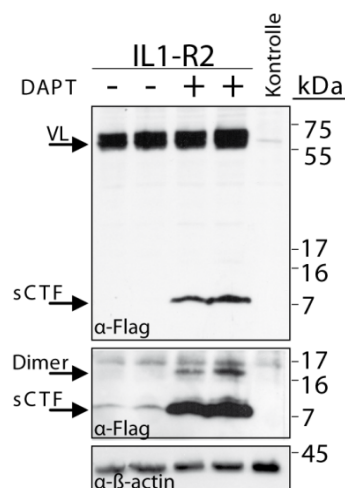
**Abbildung 18: In-Vitro Verdau von synthetischem IL-1R2 Juxtamembranpeptid mit BACE2-Ig** Ein synthetisches Peptid, welches die IL-1R2 Juxtamembrandomäne mit der vermuteten BACE Schnittstelle umfasst, wurde mit BACE2-Ig mit oder ohne den spezifischen BACE-Inhibitor C3 über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend im Massenspektrometer vermessen. Das Peptid wurde anschließend mittels eines MALDI im Reflektormodus vermessen. Im BACE2 Verdau (2) sind die wichtigen Signalspitzen mit den entsprechenden Peptidsequenzen markiert. Die im Massenspektrometer gemessenen Fragmente korrelieren mit der in der schematischen Abbildung der Sequenz angegebenen Schnittstelle. Alle Massenspektren haben den gleichen Maximalwert für die Intensität.

### 3.9. IL-1R2 ist ein neues Substrat für den $\gamma$ -Sekretase-Komplex

#### 3.9.1. IL-1R2 CTF akkumuliert unter Behandlung mit DAPT

Da IL-1R2 ähnlich wie auch viele andere Typ-I – Membranproteine wie z.B. Notch, APP, ERBB-4 und CD44 durch eine Matrixmetalloprotease sezerniert wird, wurde davon ausgegangen, dass seine membranständigen C-terminalen Fragmente (CTF) ähnlich anderer Typ-I Membranproteine durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex prozessiert würden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden mehrere Ansätze verfolgt. Zuerst wurden transient CD5-HA-IL1R2-FLAG exprimierende Zellen mit dem spezifischen  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor DAPT [147] über Nacht behandelt (Abb.19). Sollte

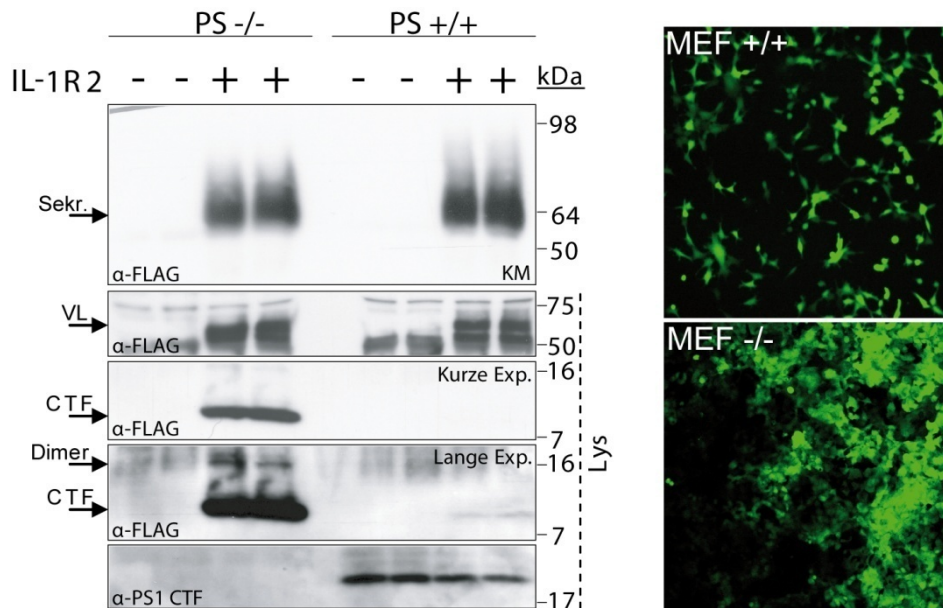
es sich bei den C-terminalen Fragmenten von IL-1R2 um  $\gamma$ -Sekretasesubstrate handeln, so müsste die Menge der C-terminalen Fragmente von IL-1R2 unter Behandlung mit DAPT zunehmen. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet, in dem auch DAPT gelöst war. Anschließend wurden die Lysate der behandelten Zellen analysiert. Verglichen zu den mit DMSO behandelten Zellen akkumulierte in den mit DAPT behandelten Zellen das schon oben erwähnte, 8 kDa große sCTF deutlich (*siehe 3.1*). Dagegen zeigte sich keine Akkumulation des 9 kDa großen ICTF. Die mittlere Abbildung zeigt eine längere Expositionszeit der C-terminalen Fragmente. Man kann erkennen, dass das sCTF auch unter Behandlung mit DMSO gebildet wird. Auf die Menge des Volllängenproteins hatte die Behandlung mit DAPT keinen Einfluss. Als Ladekontrolle wurde in einem weiteren Western Blot  $\beta$ -Aktin detektiert. Da die pharmakologische Hemmung der  $\gamma$ -Sekretase zu einer Akkumulation der CTFs von IL-1R2 führte, war dies ein erster Hinweis, dass diese durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex prozessiert werden konnten.



**Abbildung 19: IL-1R2 CTFs akkumulieren unter pharmakologischer Hemmung der  $\gamma$ -Sekretase** Transient mit HA-IL-1R2-FLAG transfizierte 293E Zellen wurden über Nacht entweder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle (-) oder mit 1  $\mu$ M DAPT (+) behandelt. Im oberen Western-Blot wurden das Volllängenprotein (VL) und die C-terminalen Fragmente (Dimer, sCTF) mit  $\alpha$ -FLAG nachgewiesen. Der mittlere Western-Blot zeigt eine längere Expositionszeit der CTFs. Als Ladekontrolle wurde auf  $\beta$ -Actin geblottet.

### 3.9.2. IL-1R2 sCTF akkumuliert in Presenilin 1/2 defizienten MEFs

Um diesen Verdacht zu erhärten, wurde in einem weiteren Experiment die Akkumulation der C-terminalen Fragmente von IL-1R2 in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) von Wildtypmäusen und Presenilin 1/2 defizienten (PS1/2  $-/-$ ) Mäusen verglichen. Diese wurden mit einem replikationsdefizienten Virus infiziert, welcher die cDNA von IL-1R2 ins Genom der MEFs integriert. Die erfolgreiche Transduktion wurde mittels EGFP (Enhanced green fluorescent protein, Verstärktes grün fluoreszierendes Protein) an einem konfokalen Mikroskop überprüft (*siehe Abb.20*). Jede Spur des Gels wurde entweder mit dem FLAG-immunpräzipitierten Protein aus dem Zelllysate einer konfluenten 10 cm Schale oder der HA-immunpräzipitierten Ektodomäne aus dem Überstand der entsprechenden Platte beladen. In den transduzierten MEFs konnten wir die charakteristische, HA-positive 55 kDa Bande der sekretierten Ektodomäne von IL-1R2 detektieren, welche in den nicht transduzierten MEFs fehlte (*Abb.20, KM*). Gleichzeitig konnte mit einem FLAG M2-Antikörper das reife Volllängenprotein in Wildtyp wie auch in den Presenilin 1/2 defizienten MEFs nachgewiesen werden. Während die Menge von Volllängenprotein und sekretierter Ektodomäne in Presenilin Wildtyp und Presenilin 1/2 defizienten MEFs annähernd gleich war, fand sich eine wesentlich größere Menge an CTF in den Presenilin 1 und 2 defizienten Zelllinien im Vergleich zu den Wildtyp-MEFs. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass das IL-1R2 CTF durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex prozessiert wird. In einem weiteren Blot für Presenilin 1 CTF mit dem Antikörper 3027 konnten gezeigt werden, dass es sich hierbei tatsächlich um Presenilin 1/2 defiziente Zellen handelt, da sie im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen kein endogenes PS1-CTF mehr bilden.



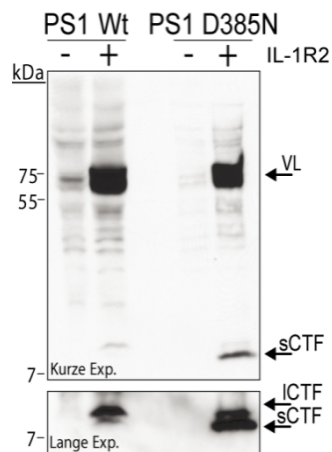
**Abbildung 20: IL-1R2 CTF akkumuliert in für Presenilin 1/2 defizienten murinen embryonalen Fibroblasten** Murine embryonale Fibroblasten wurden mit Hilfe des Murinen Moloney Leukämievirus (MMLV) mit HA-IL-1R2-FLAG transduziert. Auf die HA-IL-1R2-FLAG kodierende Sequenz folgte eine intraribosomale Eintrittsstelle (IRES) gefolgt von EGFP als Reportergen, so dass 2 Gene gleichzeitig exprimiert werden konnten. Die erfolgreiche Transduktion von Presenilin 1/2 Doppelknockout-Zellen (**MEF<sup>-/-</sup>**) und Presenilin Wildtyp-Zellen (**MEF<sup>+/+</sup>**) wurde mittels der GFP Fluoreszenz überprüft (siehe Immunfluoreszenzbilder). Die aus dem Überstand immunpräzipitierte Ektodomäne wurde mittels HA-Antikörper nachgewiesen. Die aus dem Lysat immunpräzipitierten C-terminalen Fragmente (**CTF**, **Dimer**) und das Volllängenprotein (**VL**) wurden mit dem FLAG-Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle des Presenilin-1 Knockouts wurde das C-terminale Fragment von Presenilin-1 (**PS1-CTF**) nachgewiesen. Es werden repräsentative Western-Blots von 3 unterschiedlichen Experimenten gezeigt.

### 3.9.3. Die PS1 Mutante D385N inhibiert die Prozessierung von IL-1R2 sCTF

In einem weiteren Experiment wurde die Tatsache genutzt, dass die katalytische  $\gamma$ -Sekretase Untereinheit Presenilin 1 durch eine Mutation eines der beiden für die proteolytische Aktivität wichtigen Aspartate inaktiviert werden kann. 293T Zellen, welche stabil entweder Presenilin 1 Wildtyp (PS1 wt) oder die katalytische inaktive Mutante PS1 D385N überexprimierten, wurden transient mit HA-IL-1R2-FLAG transfiziert. Bei dieser Mutante wurde in Presenilin 1 Aspartat 385 gegen Asparagin ausgetauscht. Durch die Überexpression der katalytisch inaktiven Mutante wird kaum noch endogenes Presenilin 1 Wildtyp Protein in den Komplex eingebaut, so dass es zu einer Inaktivierung der  $\gamma$ -Sekretase und damit einer Hemmung der Prozessierung



der C-terminalen Fragmente von IL-1R2 kommen sollte, falls diese durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex prozessiert werden. Im Fall von IL-1R2 führte die Transfektion von CD5-HA-IL-1R2-FLAG bei gleichen Mengen von reifem Vollängenprotein zu deutlich mehr CTF in den D385N Zellen als in den PS1 Wildtyp überexprimierenden Zellen (*Abb.21,sCTF*). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei dem C-terminalen Fragment von IL-1R2 um ein neues  $\gamma$ -Sekretase Substrat handelt.

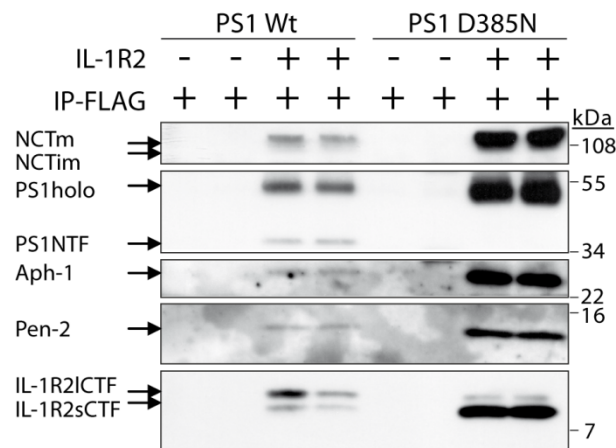


**Abbildung 21: Das C-terminale Fragment von IL-1R2 akkumuliert in Zellen mit der katalytischen Presenilin 1 Mutante D385N** Lysate von 293T Zellen, welche entweder Presenilin 1 Wt oder Presenilin 1 D385N stabil überexprimierten, wurden transient mit HA-IL-1R2-FLAG transfiziert. Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem Western-Blot mit einem FLAG-Antikörper detektiert. In den PS1 D385N exprimierenden Zellen zeigt sich eine deutliche Akkumulation der kleinen CTF (**sCTF**) bei gleichen Mengen an maturem Vollängenprotein (**VL**) im Vergleich zu PS1 Wt exprimierenden Zellen.

#### 3.9.4. IL-1R2 CTF koimmunopräzipitiert den $\gamma$ -Sekretase Komplex

In einem weiteren Experiment sollte bewiesen werden, dass das IL-1R2 CTF mit dem aktiven  $\gamma$ -Sekretase-Komplex interagiert und damit tatsächlich durch diesen gespalten werden kann. Stabil PS1 Wt oder PS1 D385N exprimierende Zellen wurden stabil mit CD5-HA-IL-1R2-FLAG transduziert. Das aus CHAPSO-Lysaten, welche vorher für 1h mit HA-Agarose von HA-IL-1R2-FLAG gereinigt wurden, mittels FLAG-Agarose immunpräzipitierte IL-1R2 CTF wurde mit einem FLAG-Antikörper nachgewiesen. Von den koimmunopräzipitierten Komponenten des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes wurden Nicastrin, Presenilin-1, Aph1 und Pen-2 mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen (*Abb. 22*). Während in den Presenilin-1 Wildtyp (PS1 wt) exprimierenden Zellen kaum CTF präzipitiert werden konnte, zeigte sich eine markante Bande für das Immunpräzipitat aus den D385N Zellen. Dies passt zu den im vorangegangenen Experiment erhobenen Daten (*siehe 3.8.3*). Während in den nicht transduzierten PS1 Wt und D385N Zellen keine Komponente des  $\gamma$ -Sekretase Komplex koimmunopräzipitiert werden konnte, zeigten sich deutliche Banden im Immunpräzipitat von HA-IL-1R2-FLAG exprimierenden Zellen für die einzelnen

Komponenten des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes wie auch für das IL-1R2-CTF. In den D385N exprimierenden Zellen konnte im Gegensatz zu den Presenilin 1 Wt exprimierenden Zellen kein Presenilin 1 NTF nachgewiesen werden. Dies ist gleichbedeutend mit einem Fehlen der Autoproteolyse und damit Aktivierung von Presenilin 1.



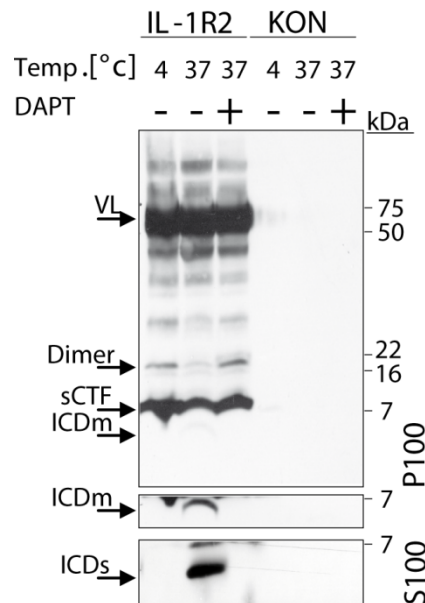
**Abbildung 22: IL-1R2 CTF koimmunopräzipitiert alle essentiellen Komponenten des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes.** Dargestellt sind die FLAG-Immunopräzipitate von jeweils einer 10cm Schale. Es wurden die koimmunopräzipitierten  $\gamma$ -Sekretase Komponenten Presenilin 1 Volllängenprotein (**PS1 holo**) Presenilin 1 NTF (**PS1NTF**), matures (**NCTm**) und immatures Nicastrin (**NCTim**), Aph-1 und Pen-2 und das immunpräzipitierte lange (**IL-1R2 I/CTF**) und das kurze IL-1R2 CTF (**IL-1R2 sCTF**). Gezeigt sind repräsentative Blots von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten

Damit lässt sich auch die wesentlich größere Menge an IL-1R2 CTF erklären. Dieses bleibt in der katalytischen Pore unprozessiert stecken, so dass es akkumuliert und sich so das CTF samt Komplex leicht immunpräzipitieren lässt. Dies zeigt, dass das IL-1R2 CTF in der Lage ist, direkt mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Komplex zu interagieren, was eine unabdingbare Voraussetzung für die proteolytische Prozessierung ist.

### 3.9.5. $\gamma$ -Sekretase In-vitro-Experiment von CD5-HA-IL-1R2-FLAG

Um zu überprüfen, ob das nach der Sekretion der IL-1R2 Ektodomäne in der Zellmembran verbleibende C-terminale Fragment von IL-1R2 in einer zeitabhängigen Reaktion durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex umgesetzt wird, wurden die Membranen von CD5-HA-IL-1R2-FLAG exprimierenden 293E Zellen präpariert, die vorher 4 h mit

PMA behandelt worden waren, um die Menge an IL-1R2-CTF in der Zellmembran anzureichern.



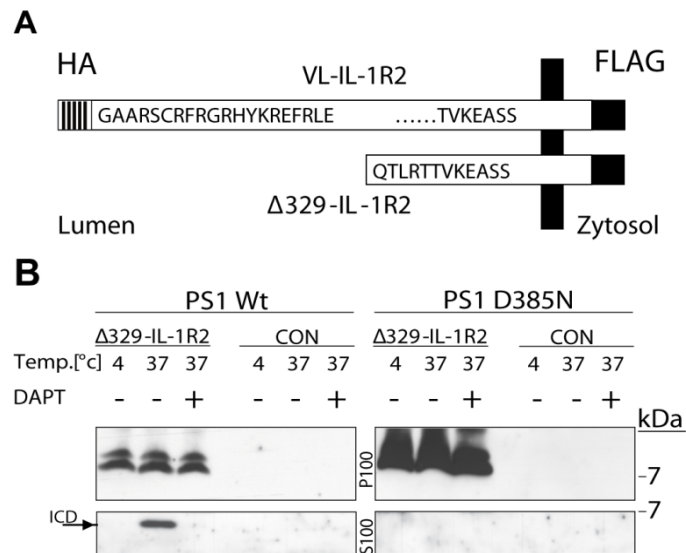
**Abbildung 23: PMA stimulierte IL-1R2 CTFs lassen sich im  $\gamma$ -Sekretase *in-vitro*-Assay zu einer intrazellulären Domäne umsetzen** Membranen von transient HA-IL-1R2-FLAG exprimierenden Zellen, wurden unter den angegebenen Bedingungen für 2h inkubiert. Anschließend wurden Membranen (**P100**) und Überstand (**S100**) per Ultrazentrifugation getrennt, um danach auf in unterschiedlichen SDS-Gelen aufgetrennt zu werden. IL-1R2 Volllängenprotein (**VL**), C-terminale Fragmente (**sCTF**, **Dimer**), membranassoziierte intrazelluläre Domäne (**ICDm**) und lösliche intrazelluläre Domäne (**ICDs**) wurden mit FLAG-Antikörper nachgewiesen.

Die Membranen wurden anschließend entweder bei 4°C, bei 37°C oder bei 37°C in Anwesenheit des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors DAPT für 2 h inkubiert. Anschließend wurden Membranen und Überstand durch einen Zentrifugationsschritt bei 100000 xg getrennt. Bei 4°C wurde weder im Überstand noch im Pellet einen Umsatz von IL-1R2-CTF zu einer intrazellulären Domäne (ICD) beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte bei 37°C eine deutliche Abnahme der Menge an IL-1R2 CTF im Pellet beobachtet werden, die gleichzeitig mit einer deutlichen, etwas tiefer laufenden Bande im Überstand und einem kleinen Anteil im Pellet einherging (*Abb.23 S100, P100*). Dabei handelt es sich um die intrazelluläre Domäne von IL-1R2. Die Anwesenheit von DAPT verhinderte die bei 37°C beobachtete Umsetzung von IL-1R2 CTF in eine im Überstand gelöste intrazelluläre Domäne. Dies spricht dafür, dass es sich um eine enzymatische Reaktion handeln muss, die bei 4°C nicht

stattfindet und bei 37°C durch den  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT unterdrückt werden kann.

### 3.9.6. $\gamma$ -Sekretase *In-vitro*-Experiment mit CD5- $\Delta$ 329-IL-1R2-FLAG

Mit dem vorigen Experiment wurde gezeigt, dass die IL-1R2 CTFs, welche von der Zelle durch Sekretion der Ektodomäne gebildet worden waren, durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex umgesetzt werden können. Nun sollte gezeigt werden, dass die Umsetzung des C-terminalen Fragmentes von IL-1R2 durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex unabhängig von einer Sekretion der IL-1R2 Ektodomäne stattfindet. Dazu wurde das Deletionskonstrukt CD5- $\Delta$ 329-IL-1R2-FLAG kloniert, dem die Ektodomäne bis auf wenige verbliebene Aminosäuren der Juxtamembrandomäne fehlt, womit es das biochemische Verhalten des IL-1R2-CTFs imitiert. Dieses Konstrukt wurde transient in HEK293T Zellen exprimiert, die entweder Presenilin-1 Wt oder die katalytisch inaktive Mutante Presenilin-1 D385N stabil exprimierten. Von diesen Zellen isolierte Membranen wurden wieder bei 4°C, 37°C oder bei 37°C in An- oder Abwesenheit des  $\gamma$ -Sekretaseinhibitors DAPT inkubiert. In den Presenilin-1 Wt exprimierenden Zellen konnte bei 37°C eine Umsetzung des Deletionskonstruktes in eine intrazelluläre Domäne beobachtet werden, welche bei 4°C nicht stattfand und bei 37°C durch DAPT inhibiert werden konnte (*siehe Abb.24 B*). In den Presenilin-1 D385N exprimierenden Zellen konnte weder bei 4°C noch bei 37°C eine Umsetzung des Deletionskonstruktes durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex beobachtet werden. Gleichzeitig war die Menge an unprozessierten CD5- $\Delta$ 329-IL-1R2-FLAG deutlich erhöht, da es durch die Inaktivität des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes in der Zellmembran akkumulierte. Dieses Experiment zeigt eindeutig, dass die  $\gamma$ -Sekretase in der Lage ist ein künstlich hergestelltes C-terminales Fragment von IL-1R2 zu prozessieren. Somit ist die Prozessierung eines Typ-I Membranproteins durch die  $\gamma$ -Sekretase entscheidend abhängig von der Länge der Ektodomäne, so dass es erst nach proteolytischer Spaltung der Ektodomäne durch eine Metalloprotease oder BACE zu einer weiteren Prozessierung durch die  $\gamma$ -Sekretase kommt.

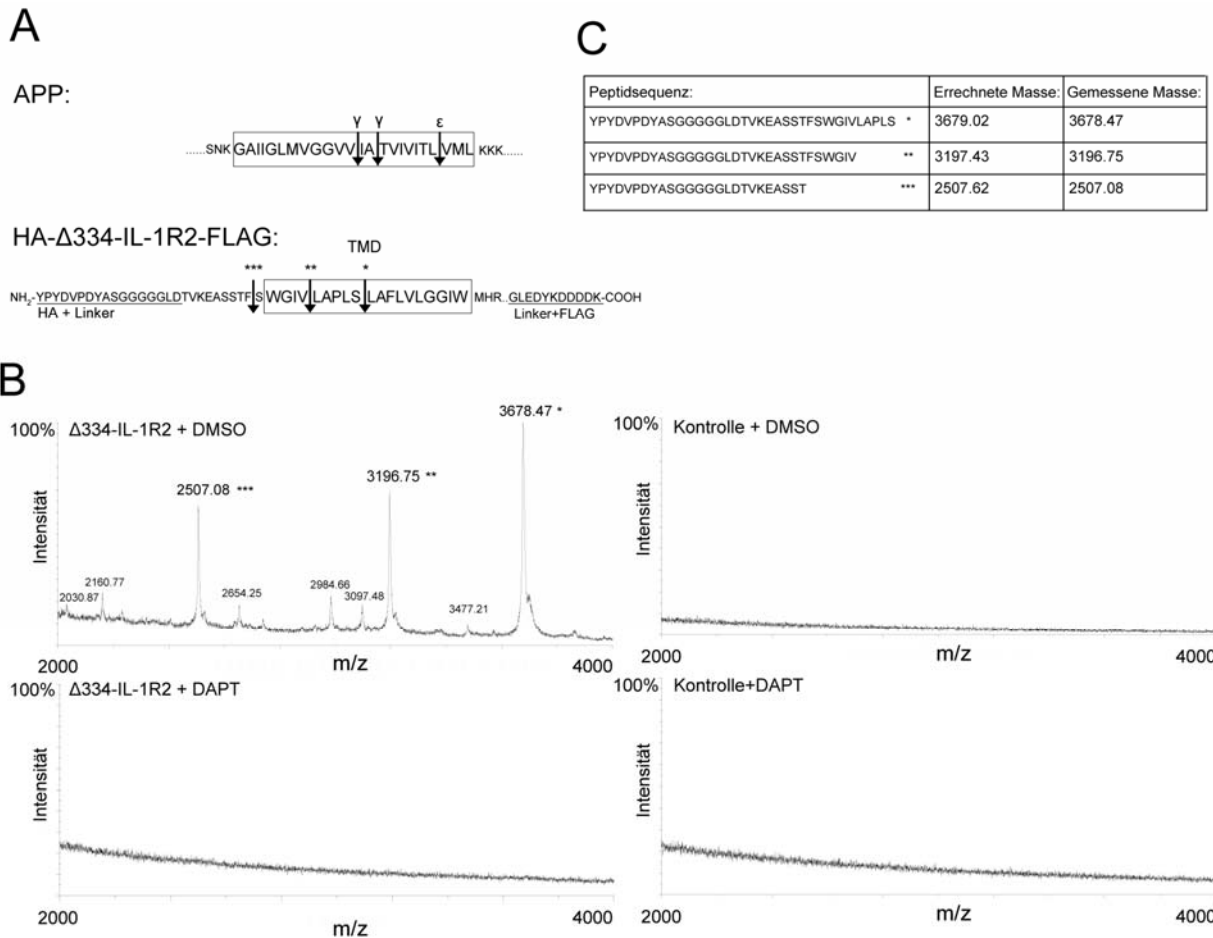


**Abbildung 24: Δ329-IL-1R2 wird im  $\gamma$ -Sekretase *in vitro* Assay zu einer intrazellulären Domäne (ICD) umgesetzt** **A** Δ329-IL-1R2 endet mit Glutamin und besitzt kein N-terminales HA-Epitop im Vergleich zum Epitop konjugierten Vollängenprotein (**VL-IL-1R2**) **B** Membranen von 293T Zellen, welche stabil entweder PS1 wt oder PS1 D385N exprimierten und transient Δ329-IL-1R2 exprimierten, wurden unter den angegebenen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden Überstand (**S100**) und Membranen (**P100**) durch einen Ultrazentrifugationsschritt getrennt. Intrazelluläre Domäne (**ICD**) und Deletionskonstrukt wurden mit einem FLAG-Antikörper im Western Blot nachgewiesen.

### 3.10. Massenspektrometrische Analyse der $\gamma$ -Sekretase Schnittstellen von IL-1R2

Um die Schnittstellen der  $\gamma$ -Sekretase in der Transmembrandomäne des C-terminalen Fragmentes von CD5-HA-IL-1R2-FLAG zu bestimmen, wurde das Deletionskonstrukt CD5-HA-Δ334-IL-1R2 kloniert, welches über ein N-terminales HA-Epitop verfügt mit Hilfe dessen die durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex sekretierten Peptide immunpräzipitiert werden können. Dieses wurde transient in HEK293EBNA Zellen exprimiert, die entweder mit DAPT oder dessen Lösungsmittelkontrolle DMSO behandelt wurden. Darüber hinaus wurden Kontroll-transfizierte Zellen mit DMSO und DAPT behandelt. Das mit HA-Agarose aufgereinigte, durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex sekretierte Peptid wurde anschließend in einem MALDI-TOF-Massenspektrometer gemessen. Dabei konnten drei große Signalspitzen mit den Massen 3678.47 Da, 3196.75 Da und 2507.08 Da gemessen werden, welche bis auf 0,5 Da mit den in GPMW (Programm zur Berechnung des Molekulargewichts von Proteinen und Polypeptiden) berechneten Massen der Peptide übereinstimmten

(Abb.25 B und C). Zwischen den großen Signalspitzen fanden sich zahlreiche kleinere Signalspitzen, über deren Abstände sich auf die Aminosäuresequenz der sekretierten Peptide zurückschließen ließ. Die Masse von 3678.47 Da entspricht einer Schnittstelle zwischen Ser-353 und Leu-354 in der Mitte der Transmembrandomäne. Die Masse 3196.75 Da entspricht einer Schnittstelle des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes zwischen Val-348 und Leu-349 im Bereich der N-terminalen Hälfte der Transmembrandomäne von IL-1R2.



**Abbildung 25: Massenspektrometrische Bestimmung der  $\gamma$ -Sekretaseschnittstellen von IL-1R2** **A** Schematische Gegenüberstellung der Transmembrandomänen von APP und HA-Δ334-IL-1R2-FLAG mit den entsprechenden Schnittstellen der  $\gamma$ -Sekretase in APP  $\gamma$  und  $\epsilon$  und der für IL-1R2 experimentell ermittelten Schnittstellen \*, \*\*, \*\*\*.  $\epsilon$  steht für den nahe der zytoplasmatischen Plasmamembrangrenze stattfindenden Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase, während  $\gamma$ - für die Schnitte der  $\gamma$ -Sekretase in der Mitte der Transmembrandomäne steht **B** Massenspektren der einzelnen HA-immunopräzipitierten Proben. Für die Signalintensität 100% wurde zur Vergleichbarkeit bei allen Massenspektren der gleiche Absolutwert festgelegt. **C** Tabelle mit den errechneten und gemessenen Massen und den entsprechenden Peptidsequenzen. Die Schnittstellen, die entsprechenden Signalspitzen im Massenspektrum und die Sequenzen wurden zu einfacheren Orientierung mittels \*, \*\* und \*\*\* bezeichnet.

Alle Signale ließen sich nur im Überstand von IL-1R2 transfizierten Zellen nachweisen, welche mit DMSO behandelt worden waren. Die Behandlung mit DAPT führte zur Unterdrückung der Signale, so dass es sich hierbei um durch die  $\gamma$ -Sekretase prozessierte Peptide handeln muss. Bei der Masse von 2507.08 Da handelt es sich vermutlich um ein Abbauprodukt der größeren durch den  $\gamma$ -Sekretasekomplex sezernierten Peptide, da der C-Terminus dieses Peptides außerhalb der Transmembrandomäne von IL-1R2 liegt, welcher höchstwahrscheinlich durch sequentielle Spaltung einer Carboxypeptidaseaktivität bedingt ist, die sequentiell die Aminosäuren vom C-Terminus des durch die  $\gamma$ -Sekretase sekretierten Peptids abspaltet und somit degradiert. Mit diesem Experiment konnte eindeutig gezeigt werden, dass der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex in der Lage ist, innerhalb der Transmembrandomäne von IL-1R2 zu schneiden wie dies auch schon für die C-terminalen Fragmente andere Typ-I Membranproteine wie APP oder CD44 beschrieben wurde [98].

## 4. Diskussion

In den letzten 10 Jahren konnten eine Reihe von Typ I Membranproteinen identifiziert werden, welche durch regulierte Intramembranproteolyse prozessiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um eine proteolytische Kaskade handelt, welche durch Spaltung der Ektodomäne entweder durch eine  $\alpha$ -Sekretase aus der Klasse der ADAM Proteasen oder durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 oder deren Homolog BACE2 initiiert werden kann [148]. Darauf folgend werden durch Intramembranproteolyse der in der Membran verbliebenen C-terminalen Fragmente ein kleines extrazelluläres lösliches Fragment und eine intrazelluläre Domäne gebildet [149]. Neben vielen als  $\alpha$ -Sekretase-Substrate identifizierten Proteinen, konnten neben APP [45, 150-153] bislang nur wenige Membranproteine wie z.B. P-Selectin Glycoproteinligand 1 (PSGL-1) [80], die Sialyltransferase ST6GAL1 [78, 79], Neuregulin-1 [73] und die zweite Beta-Untereinheit des spannungsregulierten Natriumkanals [81, 154] als weitere Substrate für die Aspartylprotease BACE1 identifiziert werden. Da APP durch  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase prozessiert wird, eignet sich APP als hervorragendes Referenzprotein, um weitere TypI-Membranproteine oder GPI-verankerte Proteine, welche durch eine  $\alpha$ -Sekretase prozessiert werden, auf ihre proteolytische Prozessierung durch BACE1 und 2 zu untersuchen.

Die proteolytische Prozessierung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 ist der Beginn der Amyloidkaskade und damit ein Schlüsselereignis in der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung [151]. 1999 und 2005 wurden in 2 Studien erhöhte Konzentrationen des Interleukin-1 Rezeptors Typ 2 (IL-1R2) im Liquor von Alzheimerpatienten im frühen und mittleren Stadium der Erkrankung festgestellt, so dass man erhöhte IL-1R2 Konzentrationen als Indikator für eine beginnende Alzheimerdemenz wertete [133, 134]. Aufgrund der Zunahme der sekretierten IL-1R2 Ektodomäne im Liquor dieser Patienten und der Zunahme der Proteinlevel von BACE1 im Gehirn von Alzheimer Patienten [155], bestand Grund zur Annahme, dass es sich bei IL-1R2 um ein weiteres BACE1 Substrat handeln könnte. Deshalb sollte in dieser Arbeit die proteolytische Prozessierung von IL-1R2 im Detail untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Ektodomäne von IL-1R2 wie auch die APP Ektodomäne durch eine Metalloprotease im Bereich der Juxtamembrandomäne



prozessiert werden kann. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass IL-1R2 durch BACE1 und 2 prozessiert werden kann. Des Weiteren wurde mittels Massenspektrometrie gezeigt, dass  $\alpha$ - und  $\beta$ -Schnittstelle im Fall von IL-1R2 nur 4 Aminosäuren voneinander entfernt liegen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die nach Spaltung der Ektodomäne in der Membran verbliebenen C-terminalen Fragmente von IL-1R2 ähnlich denen von Notch, CD44 und APP durch den  $\gamma$ -Sekretasekomplex prozessiert werden. Unter anderem wurde auch hier mittels Massenspektrometrie eindeutig gezeigt, dass der  $\gamma$ -Sekretasekomplex die C-terminalen Fragmente von IL-1R2 ähnlich wie die von Notch und CD44 innerhalb der Membran prozessiert.

#### **4.1. Die Ektodomänenspaltung von IL-1R2 wird durch eine in der Juxtamembrandomäne schneidende Metalloproteaseaktivität vermittelt**

Zuerst wurde die Spaltung der Ektodomäne von IL-1R2 untersucht. In Einklang mit anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Ektodomänenspaltung von IL-1R2 durch eine  $\alpha$ -Sekretaseaktivität aus den Familien der ADAM oder MMP Proteasen vermittelt wird [135-137]. Die Ektodomänenspaltung von IL-1R2 konnte durch Behandlung mit dem Phorbolöster PMA um das drei bis vierfache stimuliert und durch Behandlung mit dem Metalloproteaseinhibitor TAPI-1 auf etwa 1/5 des Ausgangswerts supprimiert werden. Dieses Experiment zeigt, dass IL-1R2 hauptsächlich durch eine  $\alpha$ -Sekretaseaktivität prozessiert wird. Damit verhält es sich ähnlich wie auch viele andere  $\alpha$ -Sekretasesubstrate wie z.B. APP und TGF $\alpha$  [143]. Im konditionierten Medium der in dieser Arbeit verwendeten HEK293E-Zellen, welche IL-1R2 exprimierten, konnte eine 55 kDa große sekretierte Ektodomäne nachgewiesen werden, was im Einklang mit Ergebnissen aus einer Keratinozyten Zelllinie HaCAT steht, welche stabil IL-1RII exprimierte [156]. Die Glykosylierung kann jedoch mit unterschiedlich verwendeten Zelllinien variieren. Die Sekretion eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten IL-1R2-Konstruktes (HA-SEAP-IL-1R2) konnte auf gleiche Weise mit PMA stimuliert und durch TAPI-1 inhibiert werden wie das Wildtyp-Konstrukt (*siehe* 3.5.2) und erlaubte eine genaue Quantifizierung der Zunahme beziehungsweise Abnahme der Sekretion von IL-1R2. Nach wie vor ist

jedoch unklar, durch welche Metalloproteaseaktivität IL-1R2 geschnitten werden kann, da TAPI-1 ein breites Spektrum an Metalloproteasen aus der Klasse der Matrixmetalloproteasen (MMP) und ADAM-Proteasen hemmt [146]. Aufgrund der großen Anzahl der Mitglieder beider Proteaseklassen wäre es nur mit großem Arbeitsaufwand möglich, die verantwortliche Protease zu identifizieren. Erst die neue Möglichkeit, die Expression dieser Proteasen mittels validierter small interfering RNAs (siRNA) oder small hairpin RNAs (shRNA) zu unterdrücken, wird es in Zukunft ermöglichen, die Proteasen von IL-1R2 wie auch vieler anderer Membranproteine zu identifizieren [157].

Mittels Massenspektrometrie konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Schnittstelle der unbekannten  $\alpha$ -Sekretase im proximalen Anteil der Juxtamembrandomäne sitzt. Der C-Terminus der sekretierten IL-1R2 Ektodomäne endet mit Prolin-309. Hingegen endeten in den Überstand sekretierte Peptide der Deletionsmutante  $\Delta$ 322-IL-1R2 im Massenspektrum jedoch mit Arginin-333 als C-Terminus. Dies könnte bedeuten, dass es entweder 2 unterschiedliche Schnittstellen für Metalloproteasen in IL-1R2 gibt oder, dass nach einem initialen Metalloproteaseschnitt bei Arg-333 die sekretierte Ektodomäne sequentiell durch eine Carboxypeptidaseaktivität bis Pro-309 abgebaut wird. In der Tat sind Carboxypeptidasen nicht in der Lage, Prolinreste effektiv zu schneiden [158], so dass es sich bei der aufgereinigten IL-1R2 Ektodomäne um ein stabiles Zwischenprodukt handeln könnte. Darüber hinaus konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass ein Austausch der Aminosäuren His-324 bis Ser-341 der proximalen Membrandomäne von IL-1R2 gegen die Juxtamembrandomäne des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) zu einem schlecht sekretierbaren IL-1R2 führt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass IL-1R2 zwischen His-324 und Ser-341 durch eine unbekannte  $\alpha$ -Sekretase prozessiert wird [156]. Dabei enthält die EGFR Juxtamembrandomäne erstaunlich viele Proline, von denen bekannt ist, dass sie in der Lage sind durch Zerstörung  $\alpha$ -helikaler Strukturen, die  $\alpha$ -Sekretasespaltung stark zu reduzieren. Dieses Verhalten konnte unter anderem auch für APP gezeigt werden [142, 159], was nahe legt, dass Metalloprotease abhängige Ektodomänenspaltung vornehmlich in  $\alpha$ -helikalen Strukturen stattfindet. Deshalb ist auch eine  $\alpha$ -Sekretasespaltung der IL-1R2 Ektodomäne bei Prolin-309 sehr unwahrscheinlich. Für die  $\alpha$ -Spaltung entsprechen die Ergebnisse somit den Schnittstellenverhältnissen

bei APP. Interessanterweise ist die  $\alpha$ -Schnittstelle von APP C-terminal zu einem Lysinrest lokalisiert, während die für IL-1R2 bestimmte  $\alpha$ -Schnittstelle C-terminal zu einem Arginin sitzt. Dies könnte für eine Bevorzugung positiv geladener Reste in der P'-Position durch die  $\alpha$ -Sekretase ähnliche Aktivität sprechen. Für viele Proteine ist zwar bekannt, dass sie durch eine  $\alpha$ -Sekretase Aktivität prozessiert werden, jedoch sind die dafür verantwortlichen Proteasen und die Schnittstellen im Einzelfall nicht bekannt. Obwohl für APP schon mehrere Kandidaten wie z.B. ADAM10 [60], ADAM17 und ADAM9 [46] als Kandidaten für die  $\alpha$ -Sekretasespaltung von APP vorgeschlagen worden sind, ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt, welche Proteasen für die Prozessierung der APP-Ektodomäne unter physiologischen Bedingungen in Neuronen verantwortlich sind.

#### 4.2. Proteolytische Prozessierung von IL-1R2 durch BACE1 und 2

Neben der  $\alpha$ -Spaltung von IL-1R2 wurde auch untersucht, ob IL-1R2 ein mögliches Substrat für die  $\beta$ -Sekretase BACE1 oder dessen Homolog BACE2 sein kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Transfektion von BACE1 oder BACE2 die Sekretion von IL-1R2 und die Bildung der C-terminalen Fragmente von IL-1R2 stimuliert. Da TAPI-1 in einem weiteren Experiment nicht in der Lage war, die durch BACE1 vermehrte Sekretion von IL-1R2 drastisch zu senken, muss BACE1 somit in der Lage sein, IL-1R2 unter diesen Bedingungen direkt zu schneiden, so dass eine indirekte Aktivierung der  $\alpha$ -Sekretasespaltung durch BACE1 höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden kann (*siehe Abb.15*). Gleichzeitig scheint jedoch endogenes BACE1 in HEK293E Zellen eher eine untergeordnete Rolle in der Sekretion von IL-1R2 zu spielen, da keine zusätzliche Abnahme der Ektodomänensekretion von IL-1R2 nach pharmakologischer Hemmung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretaseaktivität im Vergleich zur alleinigen Hemmung der  $\alpha$ -Sekretase beobachtet werden konnte (*siehe Abb.15*). Des Weiteren konnte in einer Kollaboration keine Abnahme der IL-1R2 Sekretion in Neuronen von BACE1 oder BACE1/2 defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen festgestellt werden (*siehe Abb.14*). Nichtsdestotrotz kann man mittels dieser Experimente keine endgültige Aussage hinsichtlich der Prozessierung von IL-1R2 durch endogenes BACE1 und 2 treffen, da auch APP nur zu einem sehr geringen Anteil durch endogenes BACE1 prozessiert wird und man auch dort keine

Abnahme der Gesamtsekretion nach Hemmung von BACE1 nachweisen kann. Dieses Problem ließ sich bei APP erst durch Verwendung für die unterschiedlichen Schnittstellen spezifischen Antikörper lösen, so dass man  $\alpha$ - und  $\beta$ -geschnittene Ektodomäne im Überstand voneinander unterscheiden konnte. Diese Antikörper stehen für IL-1R2 jedoch nicht zur Verfügung, da auch die Schnittstellen von IL-1R2 bis zu dieser Arbeit nicht bekannt waren. Darüber hinaus entstehen im Gegensatz zu IL-1R2 bei Spaltung von APP durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase unterschiedlich lange C-terminale Fragmente, welche sich im Laufverhalten in der SDS-Gelelektrophorese unterscheiden. Dies ist eine weitere Möglichkeit,  $\alpha$ - und  $\beta$ -geschnittenes APP voneinander zu unterscheiden. Die C-terminalen Fragmente von IL-1R2 nach Expression von BACE1 und BACE2 zeigten jedoch in der SDS-Gelelektrophorese das gleiche Laufverhalten wie die endogen gebildeten C-terminalen Fragmente (*siehe Abb. 12*), so dass auch hier keine Möglichkeit bestand,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Schnitt voneinander qualitativ zu unterscheiden. Die Verhältnisse sind somit ähnlich wie bei APP und BACE2 mit dem Unterschied, dass BACE1 APP deutlich von der  $\alpha$ -Schnittstelle entfernt schneidet, wohingegen IL-1R2 augenscheinlich von BACE1 und BACE2 in unmittelbarer Nähe der  $\alpha$ -Schnittstelle geschnitten werden kann. So können auch bei APP die durch  $\alpha$ -Sekretase und BACE2 induzierten APP CTFs, also C83 und C79, nicht durch eine Gelelektrophorese unterschieden werden [64, 160]. Da BACE2 APP nur zu einem geringen Anteil schneidet, ist die Menge von C83/C79 CTFs in BACE2 defizienten Zellen konsequenterweise nicht signifikant verändert gegenüber Wildtyp Zellen, da C83 immer noch und darüber hinaus wahrscheinlich kompensatorisch in einem verstärkten Ausmaß durch die  $\alpha$ -Sekretase gebildet wird. Entsprechend könnte man für IL-1R2 annehmen, dass es in BACE1 und -2 defizienten Zellen kompensatorisch vermehrt durch Metalloproteasen prozessiert wird, so dass sich die Gesamtmenge der IL-1R2 Sekretion nicht verändern würde. Im Umkehrschluss bestünde auch die Möglichkeit, dass BACE2 mehr schneidet, wenn die Aktivität der  $\alpha$ -Sekretasen abnimmt, da ein größerer Anteil des murenen IL-1R2s in die sauren Endosomen aufgenommen werden kann. So konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass IL-1R2 nach Bindung von IL1 $\beta$  vermehrt endozytiert wird [161].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Substrate auf die Prozessierung durch BACE1 und 2 untersucht. Mit dem Typ I Membranprotein TGF $\alpha$  und dem GPI-verankerten Protein CD16 konnten zwei weitere Proteine identifiziert werden, welche

nach Expression von BACE1 und 2 vermehrt in den Überstand sekretiert wurden. Hingegen konnte für die Proteine P-Selectin, TNF $\alpha$  und CD14 keine Zunahme der Sekretion nach Expression von BACE1 und 2 beobachtet werden (*siehe Abb.13*). Unter anderem konnte in einer anderen Arbeit auch für die Proteine L-Selectin und TNF-Rezeptor II keine Zunahme der Ektodomänenspaltung nach Überexpression von BACE1 beobachtet werden [80]. Dies könnte dafür sprechen, dass BACE1 und 2 nicht unspezifisch jedes Membranprotein schneiden, welches den sekretorischen Weg durchläuft, sondern diese Proteine gewisse noch unbekannte Voraussetzungen mitbringen müssen, um von BACE1 und 2 geschnitten werden zu können. Für die positiv identifizierten Substrate wurde auch die Ektodomänenspaltung in BACE1 und 2 defizienten Neuronen untersucht. Jedoch konnte für beide Proteine keine Abnahme der Ektodomänenspaltung beobachtet werden (*siehe Abb.14*), was aber aufgrund der mangelnden Auftrennung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -geschnittenen Fragmenten bei TGF $\alpha$ , dem Fehlen von C-terminalen Fragmenten bei dem GPI-verankerten Protein CD16 (*siehe Abb. 13*) und der Möglichkeit, dass diese Proteine wie APP nur minimal durch endogenes BACE1 und 2 prozessiert werden, auch in diesen beiden Fällen keine endgültige Aussage erlaubt. Nichtsdestotrotz könnte diese Diskrepanz auch daran liegen, dass nach Überexpression von BACE1 und 2 Sortierungsmechanismen der Zelle überlastet werden, so dass BACE1 und 2 in die Lage versetzt werden, neben den sauren Endosomen auch in anderen Kompartimenten wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgiapparat zu schneiden. Das BACE1 in der Lage ist im Golgiapparat zu schneiden, konnte schon für die schwedische Mutante von APP (APP-SWE) gezeigt werden, welche ein wesentlich besseres Substrat für BACE1 ist [162]. Aufgrund dieser Problematik wurden im Fall von IL-1R2 die Schnittstellen mittels eines Deletionskonstruktes von IL-1R2 (HA- $\Delta$ 322-IL-1R2), welches nur die Juxtamembrandomäne von IL-1R2 umfasst, massenspektrometrisch bestimmt.

#### **4.3. BACE1 und -2 schneiden vier Aminosäuren proximal der $\alpha$ -Schnittstelle**

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass BACE1 und -2 IL-1R2 C-terminal zu einem Phenylalanin, nur vier Aminosäuren distal der  $\alpha$ -Schnittstelle schneiden. Dies

steht mit Beobachtungen bei anderen Membranproteinen im Einklang, wonach beide Proteasen präferentiell nach hydrophoben Resten, wie z.B. nach Leucin in der schwedischen Mutante von APP (APP-SWE), in PSGL-1 und in ST6GAL1 oder nach Methionin in Wildtyp APP schneiden [78, 80, 84, 163]. BACE2 schneidet APP unter anderem auch innerhalb der A $\beta$ -Domäne zwischen zwei Phenylalaninresten vier Aminosäuren proximal der  $\alpha$ -Schnittstelle, was somit auch sehr gut zu dem identifizierten BACE1/2 Schnittmotiv von IL-1R2 passt [64]. Mittels eines *In-Vitro* Experiments konnte die *in vivo* bestimmte Schnittstelle erneut bestätigt werden. Dabei wurde gereinigtes BACE2-Ig Fusionsprotein mit einem synthetischen Peptid inkubiert, welches die Juxtamembrandomäne umfasst, was erneut zu einem Schnitt von BACE2 zwischen Phe320 und Gln321 führte. Damit konnte wiederum ein indirekter Effekt von BACE1 und 2 auf die Prozessierung der Deletionsmutante ausgeschlossen werden. Mit diesen Ergebnissen sollte es nun möglich sein, entweder einen für die  $\beta$ -Sekretase Schnittstelle von IL-1R2 spezifischen Antikörper zu generieren, um dann eventuell durch endogenes BACE1 oder 2 geschnittene IL-1R2 Ektodomäne im Überstand nachzuweisen oder den für BACE1 und 2 spezifischen Peak von 2614,07 Da im Massenspektrum, welcher auch unter endogenen BACE-Leveln gebildet wird, mittels des BACE-Inhibitors C3 zu unterdrücken [138].

Wenn ähnlich räumlich eng benachbarte Schnittstellenverhältnisse wie die für IL-1R2 gezeigt in anderen Proteinen vorkommen, könnte dies eine Charakterisierung hinsichtlich ihrer Prozessierung durch BACE1 und 2 erschweren. In der Tat konnten mit TGF $\alpha$  und CD16 zwei weitere Proteine identifiziert werden, deren Sekretion nach Überexpression von BACE1 und -2 erhöht war, deren proteolytische Prozessierung in BACE1 defizienten und BACE1 und -2 defizienten Neuronen jedoch nicht signifikant verändert war (*siehe Abb.14*). TGF $\alpha$  und CD16 werden beide durch eine  $\alpha$ -Sekretase ähnliche Spaltung in der proximalen Membrandomäne prozessiert, die augenscheinlich gleich große Fragmente wie transfiziertes BACE1 und -2 erzeugt. Deswegen werden TGF $\alpha$  und CD16 mutmaßlich ähnlich wie IL-1R2 sehr nah oder an der Metalloproteaseschnittstelle durch überexprimiertes BACE1 und -2 geschnitten. Möglicherweise könnten deshalb BACE1 und -2 eine mehr allgemeine Rolle als alternative  $\alpha$ -Sekretasen einnehmen, welche in die Sekretion von weiteren Typl, TyplI und GPI-verankerten Proteinen, die eine Ektodomänenspaltung durchlaufen, involviert sind. Diese Hypothese könnte auch den bis auf eine Hypomyelinisierung

der peripheren Nerven sonst milden Phänotyp in BACE1 defizienten und BACE1 und 2 defizienten Mäusen erklären [68, 73, 164, 165]. Hinsichtlich der großen Anzahl an ADAM und Metalloproteasen, welche zumindest teilweise redundante Funktionen ausüben [106], werden BACE1 und -2 in adulten Mäusen nur in geringen Mengen exprimiert. Wenn beide Proteasen als alternative  $\alpha$ -Sekretasen fungieren, könnte der Verlust ihrer Expression somit durch ADAM Proteasen und **Matrixmetalloproteasen** (MMP) kompensiert werden. Dadurch würde der Verlust von BACE1 und -2 nicht notwendigerweise zu einem ähnlich starken Phänotyp bei Mäusen führen, wie er für die gezielte Ausschaltung einiger ADAM Proteasen wie z.B. Tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE/ ADAM17) beschrieben worden ist [166].

Unabhängig davon, ob IL-1R2 durch endogenes BACE1 geschnitten werden kann oder nicht, könnte die Tatsache, dass IL-1R2 durch erhöhte BACE1 Expression vermehrt sekretiert wird, eine molekulare Erklärung für die erhöhten Konzentrationen von IL-1R2 im Liquor von an Alzheimer erkrankten Patienten sein, da die Expression von BACE1 im Gehirn dieser Patienten erhöht ist [155]. In einer anderen Publikation wurde vermutet, dass die erhöhten Konzentrationen von IL-1R2 bei Alzheimerpatienten eine Reaktion auf die in Alzheimer Gehirnen erhöhte Konzentration von Interleukin-1 sein könnte [133]. Aufgrund der Tatsache, dass Interleukin-1 in mehrfacher Hinsicht mit Alzheimer in Verbindung gebracht wurde, könnte es sein, dass die Zunahme der Menge an sekretiertem IL-1R2 eine zelluläre Antwort mit dem Ziel ist, die schädliche Wirkung einer zu intensiven IL-1 Signaltransduktion auf das Nervensystem einzuschränken.

#### **4.4. Das nach der Ektodomänenspaltung von IL-1R2 membran-assoziierte IL-1R2 CTF ist ein neues $\gamma$ -Sekretasesubstrat**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass IL-1R2 durch BACE1, 2 und eine unbekannte  $\alpha$ -Sekretase im Bereich der Juxtamembrandomäne geschnitten wird, wurden auch die C-terminalen Fragmente von IL-1R2 auf ihre Prozessierung durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nach der Ektodomänenspaltung von IL-1R2 zwei unterschiedlich große C-terminale Fragmente (sCTF und ICTF) in der Membran verbleiben, welche durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex prozessiert werden. Unter Behandlung von HEK293E Zellen mit

dem  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor DAPT, welche transient HA-IL-1R2-FLAG exprimierten, kam es zur Akkumulation der C-terminalen Fragmente, wobei jedoch nur die kleinere Spezies sCTF akkumulierte. Das gleiche Verhalten zeigte sich unter Verwendung der katalytisch inaktiven Presenilinmutante D385N und der Presenilin 1/2 defizienten murinen embryonalen Fibroblasten [139, 167]. Dies steht im Einklang mit der Idee, dass CTFs von Typ-I Membranproteinen nach initialer Spaltung der Ektodomäne nachfolgend durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex prozessiert werden können [168]. Dabei scheint die  $\gamma$ -Sekretase unterschiedlichen Zwecken zu dienen. Zum einen dient sie wie im Fall von Notch der Signaltransduktion, wobei nach Bindung der Notchliganden Delta oder Jagged es zu einer Spaltung der Ektodomäne von Notch durch ADAM10 oder TACE (ADAM17) kommt [169]. Dies hat zur Folge dass die intrazelluläre Domäne von Notch in den Kern transloziert wird, um dort anschließend im Zusammenspiel mit dem CSL-Komplex, als Transkriptionsfaktor zu wirken, welcher wiederum andere transkriptionelle Faktoren wie Mastermind rekrutiert [111, 169]. Zum anderen wurde vorgeschlagen, dass die  $\gamma$ -Sekretase als sogenanntes Proteasom der Membran der proteolytischen Degradation der nach der Ektodomänenspaltung membranassoziierten CTFs von Typ-I Membranproteinen dient, da mittlerweile viele Typ-I-Membranproteine identifiziert worden sind, welche durch die  $\gamma$ -Sekretase prozessiert werden, von denen jedoch nicht bekannt ist, dass sie extrinsische Signale in das Zellinnere weiterleiten [104]. Im Fall von IL-1R2 ist die physiologische Funktion der  $\gamma$ -Sekretasespaltung, ähnlich wie auch bei APP, unbekannt. So könnte es sich um einen reinen Abbauweg für das IL-1R2 CTF handeln, da im Gegensatz zum IL-1R1 die TIR Domäne fehlt, über die der NF $\kappa$ B-Signalweg aktiviert werden kann [170]. Alternativ wäre es jedoch möglich, dass die IL-1R2 ICD eine Rolle in einer Notch ähnlichen Signaltransduktionskette spielt, wenn die zytoplasmatische Domäne von IL-1R2 einer anderen Funktion als z.B. der Aktivierung von NF $\kappa$ B dienen sollte. Da auch schon anderen Proteinen mit sehr kleinen intrazellulären Domänen wie z.B. TNF $\alpha$  regulatorische Effekte zugeordnet worden sind, wäre dies auch für IL-1R2 durchaus möglich. So konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit dem immunogenen Lipopolysaccharid (LPS) die nur 35 Aminosäuren umfassende intrazelluläre Domäne von TNF $\alpha$  für die Aktivierung von Interleukin 12 in monozytären dendritischen Zellen (MDC) nötig ist [108, 110]. Um diese Frage auch für IL-1R2 zu beantworten, müssten zuerst die Bindungspartner für die zytoplasmatische Domäne von IL-1R2 identifiziert werden.



Diese könnte man durch Koimmunopräzipitation oder mittels photoaktivierbarer Aminosäuren, welche potentielle Bindungspartner nach UV-Bestrahlung vernetzen, nachweisen.

## 5.Ausblick

Damit die proteolytische Prozessierung des IL-1R2 noch besser verstanden werden kann, wäre eine Identifizierung der für die Ektodomänenspaltung von IL-1R2 verantwortlichen  $\alpha$ -Sekretase wünschenswert, um später deren Regulation durch immunologische Stimuli zu untersuchen, da IL-1R2 vor allem bei inflammatorischen Prozessen verstärkt sekretiert wird. Dazu könnte die Menge von sekretierten IL-1R2 in Zellen untersucht werden, in denen die Translation verschiedener Kandidaten wie z.B. ADAM17 oder ADAM10 mittels small hairpin RNA (shRNA) supprimiert wird. Im Gegensatz zu IL-1R2 weist IL-1R1 eine große zytoplasmatische TIR Domäne auf, an die zytoplasmatische Adapterproteine wie z.B. MyD88 und IRAK binden, um dann den NF $\kappa$ B-Signalweg zu aktivieren [117, 118]. Da für IL-1R2 eine eindeutige Spaltung der C-terminalen Fragmente von IL-1R2 gezeigt werden konnte, wäre es interessant zu verstehen, ob analog zu IL-1R2 eine  $\gamma$ -Sekretase abhängige Spaltung des IL-1RI Rezeptors notwendig ist um NF $\kappa$ B oder andere Signalkaskaden zu aktivieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass IL-1R2 durch BACE1 und BACE2 prozessiert werden kann. In der massenspektrometrischen Bestimmung der BACE1 und BACE2 Schnittstelle konnte der für  $\beta$ -geschnittenes IL-1R2 spezifische Massenpeak von 2614.75 Da auch unter endogenen Bedingungen beobachtet werden. Mit einem weiteren massenspektrometrischen Experiment, in dem endogenes BACE1 und 2 in Zellen mittels dem spezifischen BACE1 und 2 Inhibitor C3 gehemmt werden, welche das Deletionskonstrukt HA- $\Delta$ 322-IL-1R2 exprimieren, könnte endgültig und sicher bewiesen werden, ob IL-1R2 durch endogenes BACE1 oder 2 prozessiert werden kann oder nicht. Sollte IL-1R2 durch endogenes BACE1 oder 2 prozessiert werden können, so müsste der für den BACE-Schnitt spezifische Massenpeak verschwinden.

Um in Zukunft weitere BACE1 Substrate zu identifizieren, wäre ein massenspektrometrischer Ansatz, der viele Proteine gleichzeitig erfasst,

wünschenswert. So könnte man die Membranfraktionen oder Zellkulturüberstände von Wildtyp Zellen massenspektrometrisch gegen Zellen vergleichen, in denen BACE1 mittels shRNA oder pharmakologisch ausgeschaltet ist, indem man diese mit unterschiedlichen Reportergruppen versieht. Dazu bedient man sich im Augenblick zweier Methoden. Zum einen dem isobaren Affinitätstag für relative und absolute Quantifizierung (affinity tag for relative and absolute quantitation/ITRAQ), welcher nach Trypsinierung der Proteine an die freien Lysingruppen der entstandenen Peptide quervernetzt wird und zum anderen stabiles Isotopenlabeln mit Aminosäuren in Zellkultur (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture/SILAC), bei dem unterschiedlich schwere Aminosäuren, z.B. leichtes und schweres Arginin in die Proteine von Zellen inkorporiert werden. ITRAQ erlaubt es, über die bei der Fragmentierung der Peptide im Massenspektrometer entstehenden Reportergruppen eine Aussage über das relative Verhältnis der Proteinmengen zwischen zwei Proben zu treffen [171]. Bei SILAC hingegen ermöglicht die Verwendung von chemisch zwar identischen, aber aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Isotope im Massenspektrum unterschiedlicher Aminosäuren, die Trennung von zwei Peptiden, welche von der Aminosäuresequenz komplett identisch sind [172]. Mit beiden Techniken wäre es möglich weitere Substrate von BACE1 und BACE2 zu identifizieren, um damit die physiologische Funktion von BACE1 und BACE2 im menschlichen Organismus besser zu verstehen. Darüber hinaus ließen sich mit Identifizierung weiterer BACE1 und BACE2 Substrate mögliche Nebenwirkungen einer pharmakologischen Hemmung der BACE Proteasen als möglicher Therapieansatz der Alzheimerschen Erkrankung besser abschätzen.

## 6. Zusammenfassung

Die Ektodomänenspaltung und Intramembranproteolyse des Amyloid Vorläuferproteins (APP) durch  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase ist Bestandteil der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung. Dabei ist der  $\beta$ -Schnitt von APP durch die  $\beta$ -Sekretase der initiale Schritt zur Bildung der für die Alzheimersche Demenz charakteristischen A $\beta$ -Peptide. Mit der Alzheimerschen Erkrankung wurde auch eine verstärkte Prozessierung und Sekretion des Interleukin-1 Rezeptors Typ 2 (IL-1R2) in Verbindung gebracht. Bei IL-1R2 handelt es sich um einen Abfangrezeptor, welcher möglicherweise schädliche Effekte von Interleukin-1 auf das Gehirn abmildern kann.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt war über die proteolytische Prozessierung von IL-1R2 nur wenig bekannt. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass der Interleukin-1-Rezeptor Typ II (IL-1R2) ähnlich wie APP prozessiert wird [101]. In einer humanen embryonalen Nierenzelllinie exprimiertes IL-1R2 durchläuft zuerst eine  $\alpha$ -Sekretase-ähnliche Ektodomänenspaltung, was zur Sekretion der IL-1R2 Ektodomäne und der Bildung eines C-terminalen Fragmentes führt. Anschließend durchläuft das C-terminale Fragment eine Intramembranproteolyse durch den  $\gamma$ -Sekretasekomplex mit Bildung einer löslichen intrazellulären Domäne von IL-1R2. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass ein hoch spezifischer  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor, die katalytisch inaktive Presenilin1 Mutante D385N und der Knockout von Presenilin1 und 2 die Intramembranproteolyse von IL-1R2 verhinderten. Damit konnte in dieser Arbeit IL-1R2 als neues  $\gamma$ -Sekretase-Substrat etabliert werden.

Da IL-1R2 ähnlich wie APP durch  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase prozessiert wird, wurde auch die Prozessierung von IL-1R2 durch BACE1 und 2 untersucht. Überraschenderweise erhöhten BACE1 und das Homolog BACE2 die Sekretion von IL-1R2 und die Bildung von C-terminalen Fragmenten, welche fast identisch zu denen durch die  $\alpha$ -Sekretase gebildeten Fragmenten sind. Dies könnte bedeuten, dass BACE1 und BACE2 als alternative  $\alpha$ -Sekretase-ähnliche Proteasen fungieren könnten. Die vermehrte Prozessierung von IL-1R2 durch BACE1 könnte damit einen Erklärungsansatz für die erhöhte Sekretion von IL-1R2 im Gehirn von Alzheimer Patienten bieten, da bei der Alzheimer Krankheit die Aktivität von BACE1 erhöht ist. Darüber hinaus konnten BACE1 und BACE2 eine Reihe anderer Membranproteine nicht schneiden, was dafür spricht, dass beide Proteasen nicht am allgemeinen Membranproteinumsatz beteiligt sind, sondern nur spezifische Substrate schneiden können. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass BACE1 und BACE2 in der Lage sind, IL-1R2 zu schneiden.

Des Weiteren konnten die Schnittstellen aller an der Prozessierung von IL-1R2 beteiligten Proteasen mittels massenspektrometrischer Messung der entstandenen Peptidprodukte identifiziert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die  $\gamma$ -Sekretase wie auch bei APP innerhalb der Transmembrandomäne schneidet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass BACE1 und BACE2 an der gleichen Stelle schneiden und diese nur vier Aminosäuren von der  $\alpha$ -Schnittstelle entfernt ist. Somit sind die Schnittstellen ähnlich wie bei APP jedoch mit dem Unterschied, dass

sie räumlich wesentlich enger zueinander benachbart sind. Mit dieser Arbeit wurde bis auf die Identifikation der für die  $\alpha$ -Spaltung von IL-1R2 verantwortlichen Metalloproteasen der gesamte Proteolysemechanismus von IL-1R2 aufgeklärt, was dazu beiträgt, die Regulation und Bildung des sekretierten IL-1R2 im Falle eines immunologischen Stimulus besser zu verstehen. Für die Alzheimer Forschung ist IL-1R2 neben APP ein ideales Kontrollsubstrat zum Verständnis der Regulation und Spezifität dieser Proteasen. Darüber hinaus liefert die Arbeit einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Proteolyse von IL-1R2 und seiner möglichen Regulation durch BACE1 im Alzheimer Gehirn.

## 7. Aminosäurecode

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Iso	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## 8. Firmenverzeichnis

Agfa	Köln	( <a href="http://www.agfa.de">www.agfa.de</a> )
Baker	Phillipsburg, NJ, USA	( <a href="http://www.jtbaker.com">www.jtbaker.com</a> )
Biorad	München	( <a href="http://www.bio-rad.com">www.bio-rad.com</a> )
Boehringer Ingelheim	Ingelheim	( <a href="http://www.boehringer.com">www.boehringer.com</a> )
Corning	New York	( <a href="http://www.corning.com">www.corning.com</a> )
Covance	Münster	( <a href="http://www.covance.com">www.covance.com</a> )
Eppendorf	Hamburg	( <a href="http://www.eppendorf.com">www.eppendorf.com</a> )
Fermentas	Helsinki	( <a href="http://www.fermentas.com">www.fermentas.com</a> )
Fuji Film	Kiel	( <a href="http://www.fujifilm.de">www.fujifilm.de</a> )
GATC	Konstanz	( <a href="http://www.gatc.de">www.gatc.de</a> )
General Electric Lifescience	Chalfon St. Giles , Großbritannien	( <a href="http://www4.gelifesciences.com">www4.gelifesciences.com</a> )
GFL	Burgwedel	( <a href="http://www.gfl.de">www.gfl.de</a> )
Gilson	Den Haag	( <a href="http://www.gilson.com">www.gilson.com</a> )
Heraeus/Thermo Scientific	Waltham, MA 02454	( <a href="http://www.thermo.com">www.thermo.com</a> )
Hundt-Wetzlar	Wetzlar	
Invitrogen	Carlsbad, Ca US	( <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a> )
Merck	Darmstadt	( <a href="http://www.merck.de">www.merck.de</a> )
Millipore	Schwalbach	( <a href="http://www.millipore.com">www.millipore.com</a> )
New England Biolabs (NEB)	Frankfurt a. M.	( <a href="http://www.neb-online.de">www.neb-online.de</a> )
Nunc	Wiesbaden	( <a href="http://www.nunc.de">www.nunc.de</a> )
Ohaus	Pine Brook, NJ 07058, USA	( <a href="http://www.ohaus.com">www.ohaus.com</a> )
PEQLAB	Erlangen	( <a href="http://www.peqlab.de">www.peqlab.de</a> )
Perkin-Elmer	Waltham, MA 02451, USA	( <a href="http://www.perkinelmer.com">www.perkinelmer.com</a> )
Promega	Mannheim	( <a href="http://www.promega.com">www.promega.com</a> )
Roche	Grenzach, Basel	( <a href="http://www.roche.de">www.roche.de</a> )
Roth	Karlsruhe	( <a href="http://www.carl.roth.de">www.carl.roth.de</a> )
Sarstedt	Nürnbergrecht	( <a href="http://www.sarstedt.com">www.sarstedt.com</a> )
Schleicher und Schuell	Dassel	( <a href="http://www.schleicher-schuell.de">www.schleicher-schuell.de</a> )
SERVA	Heidelberg	( <a href="http://www.serva.de">www.serva.de</a> )
Sigma (Sigma-Aldrich)	Taufkirchen	( <a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a> )
Töpfer	Dietmannsried	( <a href="http://www.toepfer-gmbh.de">www.toepfer-gmbh.de</a> )
WTW	Weilheim	( <a href="http://www.wtw.de">www.wtw.de</a> )

## 9. Literaturverzeichnis

1. *About a peculiar disease of the cerebral cortex. By Alois Alzheimer, 1907 (Translated by L. Jarvik and H. Greenston). Alzheimer Dis Assoc Disord, 1987. 1(1): p. 3-8.*
2. Hebert, L.E., et al., *Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. Arch Neurol, 2003. 60(8): p. 1119-22.*
3. Bickel, H., *[Dementia syndrome and Alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in Germany]. Gesundheitswesen, 2000. 62(4): p. 211-8.*
4. Bickel, H., *[Dementia in advanced age: estimating incidence and health care costs]. Z Gerontol Geriatr, 2001. 34(2): p. 108-15.*
5. Cummings, J.L., *Alzheimer's disease. N Engl J Med, 2004. 351(1): p. 56-67.*
6. Braak, H. and E. Braak, *Argyrophilic grains: characteristic pathology of cerebral cortex in cases of adult onset dementia without Alzheimer changes. Neurosci Lett, 1987. 76(1): p. 124-7.*
7. Masters, C.L., et al., *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(12): p. 4245-9.*
8. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem Biophys Res Commun, 1984. 120(3): p. 885-90.*
9. St George-Hyslop, P., et al., *Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. Nat Genet, 1992. 2(4): p. 330-4.*
10. Cruts, M., et al., *Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. Hum Mol Genet, 1995. 4(12): p. 2363-71.*
11. Levy-Lahad, E., et al., *Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. Science, 1995. 269(5226): p. 973-7.*
12. Chartier-Harlin, M.C., et al., *Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. Nature, 1991. 353(6347): p. 844-6.*
13. Goate, A., et al., *Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. Nature, 1991. 349(6311): p. 704-6.*
14. Murrell, J., et al., *A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. Science, 1991. 254(5028): p. 97-9.*
15. Schellenberg, G.D., et al., *APP717, APP693, and PRIP gene mutations are rare in Alzheimer disease. Am J Hum Genet, 1991. 49(3): p. 511-7.*
16. Eckman, C.B., et al., *A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). Hum Mol Genet, 1997. 6(12): p. 2087-9.*
17. Murrell, J.R., et al., *Early-onset Alzheimer disease caused by a new mutation (V717L) in the amyloid precursor protein gene. Arch Neurol, 2000. 57(6): p. 885-7.*
18. Hendriks, L., et al., *Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. Nat Genet, 1992. 1(3): p. 218-21.*
19. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science, 1993. 261(5123): p. 921-3.*
20. Fryer, J.D., et al., *Human apolipoprotein E4 alters the amyloid-beta 40:42 ratio and promotes the formation of cerebral amyloid angiopathy in an amyloid precursor protein transgenic model. J Neurosci, 2005. 25(11): p. 2803-10.*
21. Rogaeva, E., et al., *The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. Nat Genet, 2007. 39(2): p. 168-77.*
22. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science, 2002. 297(5580): p. 353-6.*
23. Mori, H., et al., *Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. J Biol Chem, 1992. 267(24): p. 17082-6.*

24. Roher, A.E., et al., *beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10836-40.
25. Jarrett, J.T., E.P. Berger, and P.T. Lansbury, Jr., *The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Biochemistry, 1993. **32**(18): p. 4693-7.
26. Tamaoka, A., et al., *Biochemical evidence for the long-tail form (A beta 1-42/43) of amyloid beta protein as a seed molecule in cerebral deposits of Alzheimer's disease*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **205**(1): p. 834-42.
27. Tamaoka, A., et al., *APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid beta protein species (A beta 1-42/43 and a beta 1-40) in familial Alzheimer's disease brain*. J Biol Chem, 1994. **269**(52): p. 32721-4.
28. Hartley, D.M., et al., *Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons*. J Neurosci, 1999. **19**(20): p. 8876-84.
29. Walsh, D.M., et al., *Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25945-52.
30. Haass, C. and D.J. Selkoe, *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(2): p. 101-12.
31. Lambert, M.P., et al., *Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6448-53.
32. Townsend, M., et al., *Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers*. J Physiol, 2006. **572**(Pt 2): p. 477-92.
33. Lesne, S., et al., *A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory*. Nature, 2006. **440**(7082): p. 352-7.
34. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease is a synaptic failure*. Science, 2002. **298**(5594): p. 789-91.
35. Wasco, W., et al., *Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10758-62.
36. Sprecher, C.A., et al., *Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family*. Biochemistry, 1993. **32**(17): p. 4481-6.
37. Selkoe, D.J., et al., *Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(19): p. 7341-5.
38. Tanaka, S., et al., *Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **157**(2): p. 472-9.
39. Wertkin, A.M., et al., *Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9513-7.
40. Weidemann, A., et al., *Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein*. Cell, 1989. **57**(1): p. 115-26.
41. Hung, A.Y. and D.J. Selkoe, *Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein*. Embo J, 1994. **13**(3): p. 534-42.
42. Cai, H., et al., *BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons*. Nat Neurosci, 2001. **4**(3): p. 233-4.
43. Koo, E.H. and S.L. Squazzo, *Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway*. J Biol Chem, 1994. **269**(26): p. 17386-9.
44. Koo, E.H., et al., *Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody*. J Cell Sci, 1996. **109** ( Pt 5): p. 991-8.



45. Vassar, R., et al., *Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE*. Science, 1999. **286**(5440): p. 735-41.
46. Asai, M., et al., *Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(1): p. 231-5.
47. Ancolio, K., et al., *Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 4119-24.
48. Levy, E., et al., *Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type*. Science, 1990. **248**(4959): p. 1124-6.
49. Levy, E., F. Prelli, and B. Frangione, *Studies on the first described Alzheimer's disease amyloid beta mutant, the Dutch variant*. J Alzheimers Dis, 2006. **9**(3 Suppl): p. 329-39.
50. Haass, C., et al., *The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway*. Nat Med, 1995. **1**(12): p. 1291-6.
51. Li, Z.W., et al., *Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 6158-62.
52. Zheng, H., et al., *beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity*. Cell, 1995. **81**(4): p. 525-31.
53. von Koch, C.S., et al., *Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice*. Neurobiol Aging, 1997. **18**(6): p. 661-9.
54. Heber, S., et al., *Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members*. J Neurosci, 2000. **20**(21): p. 7951-63.
55. Herms, J., et al., *Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members*. Embo J, 2004. **23**(20): p. 4106-15.
56. Haass, C., et al., *Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 322-5.
57. Lichtenthaler, S.F., et al., *A novel substrate for analyzing Alzheimer's disease gamma-secretase*. FEBS Lett, 1999. **453**(3): p. 288-92.
58. Esch, F.S., et al., *Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor*. Science, 1990. **248**(4959): p. 1122-4.
59. Sisodia, S.S., et al., *Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing*. Science, 1990. **248**(4954): p. 492-5.
60. Lammich, S., et al., *Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3922-7.
61. Koike, H., et al., *Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein*. Biochem J, 1999. **343 Pt 2**: p. 371-5.
62. Buxbaum, J.D., et al., *Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor*. J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 27765-7.
63. Bennett, B.D., et al., *Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20647-51.
64. Fluhner, R., et al., *A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway*. J Neurochem, 2002. **81**(5): p. 1011-20.
65. Haass, C., et al., *Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments*. Nature, 1992. **357**(6378): p. 500-3.
66. Capell, A., et al., *Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 30849-54.

67. Huse, J.T., et al., *Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase*. J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33729-37.
68. Luo, Y., et al., *Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation*. Nat Neurosci, 2001. **4**(3): p. 231-2.
69. Lammich, S., et al., *Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region*. EMBO Rep, 2004. **5**(6): p. 620-5.
70. De Pietri Tonelli, D., et al., *Translational regulation of BACE-1 expression in neuronal and non-neuronal cells*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(5): p. 1808-17.
71. Rogers, G.W., Jr., G.M. Edelman, and V.P. Mauro, *Differential utilization of upstream AUGs in the beta-secretase mRNA suggests that a shunting mechanism regulates translation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2794-9.
72. Rossner, S., et al., *Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression--implications for Alzheimer's disease*. Prog Neurobiol, 2006. **79**(2): p. 95-111.
73. Willem, M., et al., *Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1*. Science, 2006. **314**(5799): p. 664-6.
74. Tesco, G., et al., *Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity*. Neuron, 2007. **54**(5): p. 721-37.
75. von Arnim, C.A., et al., *GGA1 acts as a spatial switch altering amyloid precursor protein trafficking and processing*. J Neurosci, 2006. **26**(39): p. 9913-22.
76. He, X., et al., *GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE)*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11696-703.
77. Li, Q. and T.C. Sudhof, *Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10542-50.
78. Kitazume, S., et al., *Characterization of alpha 2,6-sialyltransferase cleavage by Alzheimer's beta -secretase (BACE1)*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 14865-71.
79. Kitazume, S., et al., *In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer beta-secretase*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8589-95.
80. Lichtenthaler, S.F., et al., *The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48713-9.
81. Wong, H.K., et al., *beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase*. J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 23009-17.
82. Michailov, G.V., et al., *Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness*. Science, 2004. **304**(5671): p. 700-3.
83. Taveggia, C., et al., *Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons*. Neuron, 2005. **47**(5): p. 681-94.
84. Gruninger-Leitch, F., et al., *Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4687-93.
85. Sato, T., et al., *Active gamma -secretase complexes contain only one of each component*. J Biol Chem, 2007.
86. Lazarov, V.K., et al., *Electron microscopic structure of purified, active gamma-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 6889-94.
87. Wolfe, M.S., et al., *Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity*. Nature, 1999. **398**(6727): p. 513-7.
88. Steiner, H., et al., *Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(11): p. 848-51.
89. Fluhner, R. and C. Haass, *Signal peptide peptidases and gamma-secretase: cousins of the same protease family?* Neurodegener Dis, 2007. **4**(2-3): p. 112-6.
90. Steiner, H., et al., *PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39062-5.

91. Prokop, S., et al., *Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23255-61.
92. Niimura, M., et al., *Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12967-75.
93. Shah, S., et al., *Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor*. Cell, 2005. **122**(3): p. 435-47.
94. Chavez-Gutierrez, L., et al., *Glu 332 in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma -Secretase complex maturation but not for its activity*. J Biol Chem, 2008.
95. Cao, X. and T.C. Sudhof, *A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60*. Science, 2001. **293**(5527): p. 115-20.
96. Hebert, S.S., et al., *Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes*. EMBO Rep, 2006. **7**(7): p. 739-45.
97. Ni, C.Y., et al., *gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase*. Science, 2001. **294**(5549): p. 2179-81.
98. Lammich, S., et al., *Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 44754-9.
99. Ikeuchi, T. and S.S. Sisodia, *The Notch ligands, Delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent "gamma-secretase" cleavage*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 7751-4.
100. LaVoie, M.J. and D.J. Selkoe, *The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34427-37.
101. Kuhn, P.H., et al., *Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 11982-95.
102. De Strooper, B., et al., *A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain*. Nature, 1999. **398**(6727): p. 518-22.
103. Brown, M.S., et al., *Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans*. Cell, 2000. **100**(4): p. 391-8.
104. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *Gamma-secretase: proteasome of the membrane?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): p. 499-504.
105. Blobel, C.P., *ADAMs: key components in EGFR signalling and development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 32-43.
106. Huovila, A.P., et al., *Shedding light on ADAM metalloproteinases*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(7): p. 413-22.
107. Weihofen, A. and B. Martoglio, *Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(2): p. 71-8.
108. Friedmann, E., et al., *SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 843-8.
109. Martin, L., et al., *Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b*. J Biol Chem, 2008. **283**(3): p. 1644-52.
110. Fluhrer, R., et al., *A gamma-secretase-like intramembrane cleavage of TNFalpha by the GxGD aspartyl protease SPPL2b*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 894-6.
111. Mumm, J.S. and R. Kopan, *Notch signaling: from the outside in*. Dev Biol, 2000. **228**(2): p. 151-65.
112. Schroeter, E.H., J.A. Kisslinger, and R. Kopan, *Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 382-6.
113. Swiatek, P.J., et al., *Notch1 is essential for postimplantation development in mice*. Genes Dev, 1994. **8**(6): p. 707-19.

114. Geling, A., et al., *A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish*. EMBO Rep, 2002. **3**(7): p. 688-94.
115. Huppert, S.S., et al., *Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1*. Nature, 2000. **405**(6789): p. 966-70.
116. Greenfeder, S.A., et al., *Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex*. J Biol Chem, 1995. **270**(23): p. 13757-65.
117. Muzio, M., et al., *IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling*. Science, 1997. **278**(5343): p. 1612-5.
118. Wesche, H., et al., *MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 837-47.
119. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors*. Trends Mol Med, 2007.
120. Colotta, F., et al., *The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1*. Immunol Today, 1994. **15**(12): p. 562-6.
121. McMahan, C.J., et al., *A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types*. Embo J, 1991. **10**(10): p. 2821-32.
122. Sims, J.E., et al., *Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(13): p. 6155-9.
123. Rothwell, N., S. Allan, and S. Toulmond, *The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2648-52.
124. Griffin, W.S., et al., *Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7611-5.
125. Forloni, G., et al., *Expression of amyloid precursor protein mRNAs in endothelial, neuronal and glial cells: modulation by interleukin-1*. Brain Res Mol Brain Res, 1992. **16**(1-2): p. 128-34.
126. Goldgaber, D., et al., *Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7606-10.
127. Rogers, J.T., et al., *Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6421-31.
128. Buxbaum, J.D., et al., *Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10075-8.
129. Tachida, Y., et al., *Interleukin-1beta Upregulates TACE to Enhance alpha-Cleavage of APP in Neurons: Resulting Decrease in Abeta Production*. J Neurochem, 2007.
130. Ma, G., et al., *Short-term interleukin-1(beta) increases the release of secreted APP(alpha) via MEK1/2-dependent and JNK-dependent alpha-secretase cleavage in neuroglioma U251 cells*. J Neurosci Res, 2005. **80**(5): p. 683-92.
131. Sheng, J.G., et al., *Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo*. Exp Neurol, 2000. **163**(2): p. 388-91.
132. Mrak, R.E. and W.S. Griffin, *Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2001. **22**(6): p. 903-8.
133. Garlind, A., et al., *Soluble interleukin-1 receptor type II levels are elevated in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease patients*. Brain Res, 1999. **826**(1): p. 112-6.
134. Lindberg, C., et al., *Soluble interleukin-1 receptor type II, IL-18 and caspase-1 in mild cognitive impairment and severe Alzheimer's disease*. Neurochem Int, 2005. **46**(7): p. 551-7.
135. Orlando, S., et al., *Role of metalloproteases in the release of the IL-1 type II decoy receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31764-9.
136. Cui, X., et al., *Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6814-9.

137. Reddy, P., et al., *Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14608-14.
138. Stachel, S.J., et al., *Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1)*. J Med Chem, 2004. **47**(26): p. 6447-50.
139. Herreman, A., et al., *Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(7): p. 461-2.
140. Graham, F.L. and A.J. van der Eb, *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. Virology, 1973. **52**(2): p. 456-67.
141. Schagger, H. and G. von Jagow, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem, 1987. **166**(2): p. 368-79.
142. Sisodia, S.S., *Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 6075-9.
143. Arribas, J. and J. Massague, *Transforming growth factor- $\alpha$  and beta-amyloid precursor protein share a secretory mechanism*. J Cell Biol, 1995. **128**(3): p. 433-41.
144. Crowe, P.D., et al., *A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes*. J Exp Med, 1995. **181**(3): p. 1205-10.
145. Hooper, N.M., E.H. Karran, and A.J. Turner, *Membrane protein secretases*. Biochem J, 1997. **321** ( Pt 2): p. 265-79.
146. Mohler, K.M., et al., *Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing*. Nature, 1994. **370**(6486): p. 218-20.
147. Dovey, H.F., et al., *Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain*. J Neurochem, 2001. **76**(1): p. 173-81.
148. Selkoe, D.J. and D. Schenk, *Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. **43**: p. 545-84.
149. Haass, C., *Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation*. Embo J, 2004. **23**(3): p. 483-8.
150. Hussain, I., et al., *Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase*. Mol Cell Neurosci, 1999. **14**(6): p. 419-27.
151. Sinha, S., et al., *Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain*. Nature, 1999. **402**(6761): p. 537-40.
152. Yan, R., et al., *Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity*. Nature, 1999. **402**(6761): p. 533-7.
153. Lin, X., et al., *Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1456-60.
154. Kim, D.Y., et al., *BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(7): p. 755-64.
155. Li, R., et al., *Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3632-7.
156. Neumann, D., et al., *The membrane form of the type II IL-1 receptor accounts for inhibitory function*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3350-7.
157. Moffat, J., et al., *A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen*. Cell, 2006. **124**(6): p. 1283-98.
158. Vanhoof, G., et al., *Proline motifs in peptides and their biological processing*. Faseb J, 1995. **9**(9): p. 736-44.
159. Haass, C., et al., *Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor*. J Biol Chem, 1994. **269**(26): p. 17741-8.
160. Sun, X., et al., *Distinct transcriptional regulation and function of the human BACE2 and BACE1 genes*. Faseb J, 2005. **19**(7): p. 739-49.
161. Bourke, E., et al., *IL-1 beta scavenging by the type II IL-1 decoy receptor in human neutrophils*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 5999-6005.

162. Thinakaran, G., et al., *Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the "beta-secretase" site occurs in the golgi apparatus.* J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9390-7.
163. Turner, R.T., 3rd, et al., *Subsite specificity of memapsin 2 (beta-secretase): implications for inhibitor design.* Biochemistry, 2001. **40**(34): p. 10001-6.
164. Roberds, S.L., et al., *BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics.* Hum Mol Genet, 2001. **10**(12): p. 1317-24.
165. Dominguez, D., et al., *Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice.* J Biol Chem, 2005. **280**(35): p. 30797-806.
166. Jackson, L.F., et al., *Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling.* Embo J, 2003. **22**(11): p. 2704-16.
167. Steiner, H., et al., *Endoproteolysis of the ER stress transducer ATF6 in the presence of functionally inactive presenilins.* Neurobiol Dis, 2001. **8**(4): p. 717-22.
168. Haass, C. and H. Steiner, *Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases.* Trends Cell Biol, 2002. **12**(12): p. 556-62.
169. Bray, S.J., *Notch signalling: a simple pathway becomes complex.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 678-89.
170. O'Neill, L.A. and A.G. Bowie, *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 353-64.
171. Overall, C.M. and R.A. Dean, *Degradomics: systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer.* Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(1): p. 69-75.
172. Ong, S.E., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.* Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-86.

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Peer-Hendrik Kuhn

geboren am 20. November 1980

in Mainz

### Schulische Ausbildung:

1987-1988            Städtische katholische Grundschule Frankenforst, Köln

1988-1991            Wichern-Schule, Düsseldorf

1991-1993            Gymnasium am Poth, Düsseldorf

1993-2000            Wilhelmsgymnasium, Kassel

2000                 Allgemeine Hochschulreife

2000-2001            Zivildienst im Klinikum Kassel

### Studium:

Oktober 2001            Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU-München

April 2003             Physikum

29.April 2008           Staatsexamen Medizin

10.Juli 2008            Approbations als Arzt

### Stipdendium:

2003-2005            Stipendium des Promotionstudiums Molekulare Medizin (FöFoLe der LMU)

## 11. Schriftenverzeichnis

- 1. Friedmann, E., E. Hauben, K. Maylandt, S. Schleegeer, S. Vreugde, S.F. Lichtenthaler, P.H. Kuhn, D. Stauffer, G. Rovelli, and B. Martoglio,  
**SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production.**  
Nat Cell Biol, 2006. 8(8): p. 843-8.
- Kuhn, P.H., E. Marjaux, A. Imhof, B. De Strooper, C. Haass, and S.F. Lichtenthaler.  
**Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase.**  
J Biol Chem 2007 Apr 20 [cited 282 16]; p.11982-95
- 1. Schobel, S., S. Neumann, M. Hertweck, B. Dislich, P.H. Kuhn, E. Kremmer, B. Seed, R. Baumeister, C. Haass, and S.F. Lichtenthaler,  
**A novel sorting nexin modulates endocytic trafficking and alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein.**  
J Biol Chem, 2008. 283(21): p. 14257-68.



## 12. Danksagung

Ich danke Herrn Dr. Stefan Lichtenthaler für die Überlassung dieses interessanten Themas und die stetige Unterstützung bei meinen ersten und weiterführenden Schritten in der Wissenschaft. Er war zu jeder Zeit ein zuverlässiger Betreuer mit allzeit offenem Ohr und verstand es, auch in schwierigen Situationen aufmunternde Worte zu finden. Er war unermüdlich in wissenschaftlichen Diskussionen und teilte bereitwillig sein unerschöpfliches Wissen an Methoden und Publikationen.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Christian Haass, dass er es mir ermöglichte an seinem Lehrstuhl diese Arbeit durchzuführen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Anna Pils für das Korrekturlesen dieser Arbeit, aufmunternde Worte und manch leckeres Essen bedanken. Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Stoffwechselbiochemie und des Zentrallabors für Proteinanalytik, die mich unterstützt haben.

Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium des Promotionsstudiums für Molekulare Medizin, initiiert durch Prof. Heesemann und Mitarbeitern, unterstützt.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern für die mentale wie auch finanzielle Unterstützung bedanken, die es mir erst ermöglicht hat, meiner Leidenschaft, der Forschung, nachzugehen. Sie und meine beiden Geschwister Frederik und Louisa mussten oft auf mich verzichten, wenn die Forschung mich aus einem viel zu kurzem Urlaub wieder ins Labor trieb.

## 13. Publikationen

# Regulated Intramembrane Proteolysis of the Interleukin-1 Receptor II by $\alpha$ -, $\beta$ -, and $\gamma$ -Secretase\*

Received for publication, January 12, 2007, and in revised form, February 15, 2007 Published, JBC Papers in Press, February 16, 2007, DOI 10.1074/jbc.M700356200

Peer-Hendrik Kuhn<sup>‡</sup>, Els Marjaux<sup>§</sup>, Axel Imhof<sup>‡</sup>, Bart De Strooper<sup>§</sup>, Christian Haass<sup>‡</sup>, and Stefan F. Lichtenthaler<sup>‡1</sup>

From the <sup>‡</sup>Adolf-Butenandt-Institut, Ludwig-Maximilians-University, Schillerstrasse 44, 80336 Munich, Germany and the <sup>§</sup>Center for Human Genetics, Department of Molecular and Developmental Genetics, Flanders Interuniversity Institute of Biotechnology, Katholieke Universiteit Leuven, Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium

Ectodomain shedding and intramembrane proteolysis of the amyloid precursor protein (APP) by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase are involved in the pathogenesis of Alzheimer disease (AD). Increased proteolytic processing and secretion of another membrane protein, the interleukin-1 receptor II (IL-1R2), have also been linked to the pathogenesis of AD. IL-1R2 is a decoy receptor that may limit detrimental effects of IL-1 in the brain. At present, the proteolytic processing of IL-1R2 remains little understood. Here we show that IL-1R2 can be proteolytically processed in a manner similar to APP. IL-1R2 expressed in human embryonic kidney 293 cells first undergoes ectodomain shedding in an  $\alpha$ -secretase-like manner, resulting in secretion of the IL-1R2 ectodomain and the generation of an IL-1R2 C-terminal fragment. This fragment undergoes further intramembrane proteolysis by  $\gamma$ -secretase, leading to the generation of the soluble intracellular domain of IL-1R2. Intramembrane cleavage of IL-1R2 was abolished by a highly specific inhibitor of  $\gamma$ -secretase and was absent in mouse embryonic fibroblasts deficient in  $\gamma$ -secretase activity. Surprisingly, the  $\beta$ -secretase BACE1 and its homolog BACE2 increased IL-1R2 secretion resulting in C-terminal fragments nearly identical to the ones generated by the  $\alpha$ -secretase-like cleavage. This suggests that both proteases may act as alternative  $\alpha$ -secretase-like proteases. Importantly, BACE1 and BACE2 did not cleave several other membrane proteins, demonstrating that both proteases do not contribute to general membrane protein turnover but only cleave specific proteins. This study reveals a similar proteolytic processing of IL-1R2 and APP and may provide an explanation for the increased IL-1R2 secretion observed in AD.

Regulated intramembrane proteolysis (RIP)<sup>2</sup> is a two-step proteolytic cleavage mechanism required for signal transduc-

tion and the degradation of membrane proteins (reviewed in Refs. 1, 2). The first cleavage is referred to as ectodomain shedding and occurs within the ectodomain at a peptide bond very close to the transmembrane domain. This results in the secretion of most of the ectodomain (reviewed in Refs. 3, 4) and the generation of a membrane-bound stub, which can undergo a second cleavage within its transmembrane domain, called intramembrane proteolysis (reviewed in Ref. 5). Numerous type I membrane proteins, including Notch, CD44, and the amyloid precursor protein (APP), undergo RIP. The ectodomain shedding is carried out by members of the ADAM (a disintegrin and metalloprotease) family and additionally by matrix metalloproteases and to a lower extent by the aspartyl proteases BACE1 and BACE2 ( $\beta$ -site APP-cleaving enzymes 1 and 2) (for a review see Ref. 6). The subsequent intramembrane proteolysis is catalyzed by the  $\gamma$ -secretase protease complex, consisting of the essential proteins PS1 and PS2 (presenilin 1 or 2), nicastrin, Pen-2, and Aph-1 (for a review see Ref. 7). The presenilins are assumed to constitute the active site of  $\gamma$ -secretase by providing two aspartic acid residues that are critical for  $\gamma$ -secretase activity (8). Nicastrin functions as a receptor for  $\gamma$ -secretase substrates (9). As a result of  $\gamma$ -secretase cleavage, the C-terminal fragments (CTFs) of type I membrane proteins are processed to two smaller fragments. A small peptide is secreted into the extracellular space, whereas the intracellular domain is released into the cytosol. For some of these proteins, such as the cell surface receptor Notch and the cell adhesion proteins N- and E-cadherin, the liberated intracellular domain may participate in signal transduction through different mechanisms (2), whereas for other proteins, such as APP, the intracellular domain may be degraded without a prior role in signaling (10).

One of the proteins, for which RIP has been studied in much detail, is APP. In contrast to several other proteins undergoing RIP, the ectodomain cleavage of APP is not only catalyzed by one but by three different proteases, which cleave at distinct peptide bonds. Shedding of APP mainly occurs by an ADAM metalloprotease, which is also referred to as  $\alpha$ -secretase and cleaves within the A $\beta$  sequence (reviewed in Ref. 11). Addition-

\* This work was supported by the Molecular Medicine Program of the Medical School of the University of Munich (to P.-H. K., S. F. L., and C. H.), the Deutsche Forschungsgemeinschaft for Projects SFB596-B12 (to S. F. L.), SFB596-A9 (to C. H.), and SFB596-Z1 (to A. I.), the Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek-Vlaanderen (to E. M.), the Alzheimer Forschung Initiative e.V. (to S. F. L.), and the European Commission for NeuroNE (to C. H. and B. D. S.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 49-89-218075453; Fax: 49-89-218075415; E-mail: Stefan.Lichtenthaler@med.uni-muenchen.de.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: RIP, regulated intramembrane proteolysis; APP, amyloid precursor protein; AD, Alzheimer disease; IL-1R2, interleukin-1 receptor II; ADAM, a disintegrin and metalloprotease; CTF, C-terminal frag-

ment; sCTF, short CTF; lCTF, long CTF; BACE,  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme; HA, hemagglutinin; PBS, phosphate-buffered saline; NTF, N-terminal fragment; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor; MS, mass spectrometry; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; CHAPSO, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid; SFV, Semliki Forest virus; GPI, glycosylphosphatidylinositol; AP, alkaline phosphatase; ICD, intracellular domain; IL-1, interleukin-1; PS1, presenilin 1.

ally, BACE1 (also referred to as  $\beta$ -secretase) and its homolog BACE2 cleave in the ectodomain of APP. BACE1 cleaves APP at the N terminus of the A $\beta$  peptide domain, thus catalyzing the first step in the generation of the A $\beta$  peptide (reviewed in Ref. 12), which is deposited in the brain of patients suffering from Alzheimer disease (AD) (reviewed in Ref. 13). BACE2 cleaves APP close to the  $\alpha$ -secretase cleavage site within the A $\beta$  domain and thus acts as an alternative  $\alpha$ -secretase (14), preventing the release of an intact A $\beta$  peptide.

An additional substrate for ectodomain shedding is the type II receptor for interleukin-1 (IL-1), which is widely expressed, including neurons (15). IL-1 is a potent inflammatory and immunoregulatory cytokine and is a key factor in the events leading to neurodegeneration following brain trauma, stroke, and brain inflammation. IL-1 can bind to two types of receptors (for an overview see Ref. 16). Binding to the type I receptor (IL-1R1) initiates a signaling cascade that finally leads to NF $\kappa$ B activation. In contrast, the type II receptor (IL-1R2) acts as a decoy receptor, which is capable of binding IL-1 but is incapable of signaling to NF $\kappa$ B and thus acts as a "ligand sink" preventing IL-1 from binding to IL-1R1. IL-1R2 is a single-span membrane protein that contains a large extracellular ligand-binding domain, followed by a transmembrane domain and a short cytoplasmic domain of 29 amino acids. This cytoplasmic domain lacks the Toll/IL-1R domain found in the type I receptor, which would be required for the signal transduction by binding and recruiting cytosolic adaptors and kinases, such as MyD88 and IRAK. IL-1 and its signaling have been implicated in multiple ways in AD (reviewed in Ref. 17), but the underlying molecular mechanisms are not yet well understood. For example, brain trauma, which is a risk factor for AD, enhances IL-1 expression. Likewise, increased IL-1 expression has been observed in AD (reviewed in Ref. 18). In turn, overnight stimulation of astrocytes with IL-1 strongly stimulates translation of APP mRNA, leading to increased APP protein levels (19). Potentially, this may result in increased A $\beta$  peptide generation. However, short term treatment of neuroglioma cells with IL-1 has also been shown to stimulate  $\alpha$ -secretase cleavage of APP (20), which may prevent A $\beta$  generation and increase the secretion of a soluble APP form that is neuroprotective and neurotrophic (reviewed in Ref. 21). Genetic analyses have linked polymorphisms in the two IL-1 genes, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , to an increased risk of AD. Interestingly, both polymorphisms appear to increase IL-1 production *in vitro* or *in vivo* (reviewed in Ref. 18). An additional connection between IL-1 and AD is the finding that the soluble, secreted form of IL-1R2 is elevated in cerebrospinal fluid of patients with mild to moderate AD but not in the late stages of the disease (22, 23). Given that secreted IL-1R2 binds IL-1 and acts as a sink for IL-1, the increase in IL-1R2 shedding may be a way of trying to limit detrimental consequences of increased IL-1 expression and activity in the brain. However, the molecular mechanisms governing the proteolytic processing of IL-1R2 are little understood, but the processing seems to depend at least partly on a metalloprotease activity (24, 25), which may be the ADAM protease TNF-converting enzyme (ADAM17) (26). A more detailed knowledge of IL-1R2 processing may help to better understand the role of IL-1R2

secretion and of IL-1 in the AD brain. Here we show that IL-1R2 undergoes a similar set of proteolytic cleavages as APP.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Reagents**—The following antibodies were used: anti-HA epitope antibody HA.11 (Covance); anti-FLAGM2 antibody, anti-FLAGM2-agarose, anti-HA-9658 antibody, anti-BACE1-NT antibody, and HA-agarose (Sigma); horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit secondary antibody (DAKO); Alexa 488-coupled anti-rabbit and Alexa 594 anti-mouse antibodies (Molecular Probes); anti-BACE1 and BACE2 (ProSci, against their C termini). Antibodies 6687 (against APP C terminus) (27) and 3027 (against PS1 loop) (28) were described previously. Antibody 22C11 (anti APP ectodomain) was provided by Konrad Beyreuther. Nicastrin antibody N1660 (Sigma), monoclonal presenilin NTF (29), Pen-2 1638 (30), and Aph-1 433G (31) antibodies were described before. PMA was obtained from Sigma. The metalloprotease inhibitor TAPI-1 was purchased from Peptides International. Dodecyl maltoside was purchased from Calbiochem. CHAPSO was purchased from Biomol, and the BACE inhibitor C3 was from Calbiochem ( $\beta$ -secretase inhibitor IV). BACE2-Fc fusion protein was kindly provided by Regina Fluhrer.

**Plasmid Construction**—Generation of vector peak12 expressing BACE1, BACE2, and HA-tagged alkaline phosphatase (AP) (HA-AP, soluble AP) has been described (32). The cDNAs of all shedding substrates are of human origin. Plasmid peak12/PSGL-1 3tag was described previously (32) and encodes the signal peptide of CD5, followed by an HA epitope tag and the coding sequence of PSGL-1 with an AU1 tag in the extracellular domain and a FLAG tag in the cytoplasmic domain. The PSGL-1 sequence can be cut out using an XbaI and a NotI restriction site. Peak12/HA-Xba-FLAG was generated by PCR and encodes an HA tag between the HindIII and the XbaI site and a FLAG tag between the XbaI and the NotI site. To obtain peak12/CD5-HA-Xba-FLAG, the HindIII/XbaI fragment of peak12/PSGL-1 3tag was cloned into peak12/HA-Xba-FLAG and encodes the CD5 signal peptide followed by an HA and a FLAG tag. The plasmids encoding full-length IL-1R2 or its deletion mutant (lacking part of the ectodomain) (peak12/IL-1R2, peak12/ $\Delta$ 334-IL-1R2 and peak12/ $\Delta$ 322-IL-1R2) carry the CD5 signal peptide (MPMGSLLQPLATLYLLGMLVASVLG), an N-terminal HA tag (YPYDVPDYA followed by the linker sequence SGGGGGLE or SGGGGGLD for the  $\Delta$ 334 mutant), and a C-terminal FLAG tag and were generated by PCR using appropriate primers. Peak12/ $\Delta$ 329-IL-1R2 was generated in the same way but has no N-terminal HA tag. The PCR fragments (lacking the native signal peptide sequence of IL-1R2) were cloned into the XbaI site of peak12/CD5-HA-Xba-FLAG. Thus, the first amino acid of the IL-1R2 sequence is amino acid Gly-23 of full-length IL-1R2 (numbering corresponding to protein accession number NP\_004624 in the NCBI data base). Amino acid numbers of the IL-1R2 deletion mutants ( $\Delta$ 322,  $\Delta$ 329, and  $\Delta$ 334) indicate that the deletions stop before the given amino acid number, which refers to its position within the HA-IL-1R2-FLAG full-length sequence (counting without the CD5 signal peptide). Vector peak12/MMP-IL-1R2 was used for retroviral generation and was obtained by cloning the Hin-



dIII/NotI fragment of peak12/IL-1R2 into the HindIII/NotI sites of the peak12/MMP-KiA vector (33). An additional IRES-GFP cassette from peak12/MMP-TK-IRES-GFP (obtained from Felix Randow; IRES is of encephalomyocarditis virus origin) was cloned into the NotI site of peak12/MMP-IL-1R2 to yield peak12/MMP-IL-1R2-IRES-GFP. Vectors pMDtet.G and pMD.gagpol were described previously (34). The coding sequences of CD14 (GPI-anchored protein), CD16 (GPI-anchored protein), and P-selectin (all three lacking the native signal peptide sequence) were amplified by PCR, digested with XbaI and NotI, and cloned into plasmid peak12/PSGL-1 3tag, which was cut with XbaI and NotI. The resulting plasmids encode the CD5 signal peptide followed by an HA epitope tag and the corresponding protein sequence. As templates, pCDM12/CD14 and CD16 (obtained from Brian Seed) and pCMV/P-selectin (obtained from Denisa Wagner) were used. Peak12/pro-TGF $\alpha$ -HA encodes human pro-TGF $\alpha$  with an HA tag inserted between amino acids His-43 and Phe-44, which is four amino acids C-terminal to the Ala-Val propeptide cleavage site. Thus, after signal peptide and propeptide cleavage, the mature pro-TGF $\alpha$  and the soluble TGF $\alpha$  retain the HA tag. Peak12/HA-pro-TGF $\alpha$ -FLAG contains an additional FLAG tag at the C terminus of pro-TGF $\alpha$  and was generated by cloning the HindIII/XbaI-digested PCR fragment of HA-tagged pro-TGF $\alpha$  into the HindIII and XbaI sites of peak12/CD5-HA-XBA-FLAG. TGF $\alpha$  and TNF $\alpha$  cDNAs were from ATCC. Peak12/FLAG-TNF $\alpha$ -HA was created by cloning a PCR fragment of FLAG-TNF $\alpha$  containing a 5'-HindIII site and a 3'-XbaI site that was then inserted into HindIII/XbaI peak vector, which has an HA tag between the XbaI and the NotI site. The N-terminal, cytoplasmic FLAG tag was added to TNF $\alpha$  by PCR and suitable primers and was cloned into the HindIII/NotI sites of the peak12 vector, resulting in peak12/FLAG-TNF $\alpha$ . For expression in neurons and glial cells IL-1R2, TGF $\alpha$  and CD16 were cut out from the corresponding peak12 plasmids using HindIII and NotI, blunt-ended, and ligated into the SmaI site of the Semliki Forest virus (SFV) type 1. The identity of all constructs obtained by PCR was confirmed by DNA sequencing.

**Cell Culture, Transfections, Western Blot**—Human embryonic kidney 293-EBNA cells (HEK293) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (Hyclone) as described (35). Cells stably expressing wild-type PS1 or its catalytically inactive mutant PS1 D385N are HEK293 cells without the EBNA gene (36). These cells were cultured as above with an additional 200  $\mu$ g/ml Zeocin (Invitrogen). G418 was added to culture murine embryonic fibroblasts PS1/2<sup>-/-</sup> knock-out cells. Transfections were carried out using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). One day after transfection, the medium was replaced with fresh medium. After overnight incubation, conditioned medium and cell lysate (in 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40) were collected.

To analyze the effect of PMA and TAPI-1 on shedding, cells were treated as described previously (32). For the detection of secreted and cellular APP by immunoblot, the protein concentration in the cell lysate was measured, and corresponding aliquots of lysate or conditioned medium were directly loaded onto an electrophoresis gel. For transient transfections of

IL-1R2, TGF $\alpha$ , CD14, and CD16 either together with BACE1 or BACE2, alkaline phosphatase (AP; plasmid HA-AP) was cotransfected as a transfection efficiency control. AP activity was measured as described previously (32, 37). Aliquots of the conditioned medium were treated for 30 min at 65 °C to heat-inactivate the endogenous alkaline phosphatase activity. Corresponding aliquots of lysate or conditioned medium were loaded onto the gel. Immunoblot detection was carried out using the indicated antibodies.

**Infection of Primary Neurons and Glial Cells with SFV**—Cortical neurons and glial cells were prepared from E14 mouse embryos from BACE1-deficient and BACE1, BACE2 double-deficient mice as described (38, 39). The BACE knock-outs were verified by Northern and Western blot detection and by functional analysis demonstrating that APP cleavage by BACE was virtually eliminated in the neurons (39).

Preparation of recombinant SFV stocks has been described previously (40). Virus was diluted 1:100 in conditioned culture medium and added to 4-day-old neurons. Two hours post-infection, cells were labeled with 100  $\mu$ Ci/ml [<sup>35</sup>S]methionine/cysteine for 6 h and lysed in immunoprecipitation buffer (1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS in TBS buffer). IL-1R2, TGF $\alpha$ , and CD16 full-length and CTFs were immunoprecipitated using anti-FLAG antibody. Immunoprecipitated material was separated by SDS-PAGE, and dried gels were exposed to a PhosphorImager (Amersham Biosciences).

**Retroviral Transduction**—To produce retroviral supernatants (replication-deficient Moloney murine leukemia virus), plasmids pMDtet.G and pMD.gagpol and either peak12/MMP-GFP or peak12/MMP-HA-IL-1R2-FLAG-IRES-GFP were transfected into HEK293 cells by calcium phosphate precipitation. Medium was changed after 24 h, collected after 48 h, and filtered through a sterile filter. The retroviral transductions were carried out using Polybrene (Sigma).

**In Vitro Generation of IL-1R2-ICD**—293E cells transiently expressing full-length IL-1R2 were incubated for 4 h with PMA prior to membrane preparation. Membrane preparations were generated as described (41) and were resuspended in citrate buffer (pH 6.4, 5 mM EDTA, inhibitor mixture from Roche Applied Science) with or without 1  $\mu$ M DAPT and then incubated either at 4 or 37 °C for 2 h. After incubation the supernatant and membranes were separated via ultracentrifugation. HEK293 cells (without EBNA) stably expressing wild-type PS1 or PS1 D385N and additionally transiently expressing peak12/ $\Delta$ 329-IL-1R2-FLAG were directly subjected to membrane preparation without prior PMA incubation and then treated as above.

**Coimmunoprecipitation of  $\gamma$ -Secretase Complex with IL-1R2 Substrate**—HA-IL-1R2-FLAG was retrovirally transduced into HEK293 cells stably expressing either PS1 WT or the catalytic inactive mutant PS1 D385N. For immunoprecipitation, one 10-cm dish of each cell line was lysed in standard STE (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 2 mM EDTA) + 1% CHAPSO buffer followed by a clarifying spin at 13,000 rpm with a Heraeus cryocentrifuge and a further purification step at 55,000 rpm in a Beckman ultracentrifuge with a TLA-55 rotor. Prior to immunoprecipitation of CTFs with FLAG M2 affinity agarose, the lysates were immunoprecipitated with HA affinity agarose for 2 h leading to

a depletion of IL-1R2 full-length protein in the lysate. Subsequently, after a 2-h incubation with the lysate, FLAG M2-agarose was washed two times each with 0.1% CHAPSO wash buffer and STE buffer and afterward eluted with 100  $\mu$ g of FLAG peptide and subjected to SDS-PAGE. Immunoblot detection was carried out for IL-1R2 CTF and the  $\gamma$ -secretase complex components nicastrin, presenilin 1 NTF, Aph-1, and Pen-2.

**Mass Spectrometry of IL-1R2 Cleavage Sites**—For analysis of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -cleavage of secreted IL-1R2 peptides, HEK293 cells were transfected with peak12/IL-1R2, peak12/ $\Delta$ 334-IL-1R2, or peak12/ $\Delta$ 322-IL-1R2. 48 h after transfection, fresh medium was incubated for 4 h and subsequently put on ice. In case of peak12- $\Delta$ 322-IL-1R2, medium was supplemented with 1 mmol of DAPT during incubation to prevent turnover by  $\gamma$ -secretase. Protease inhibitor mixture (Sigma) was added at a dilution of 1:100. Medium was then subjected to a clarifying spin by centrifugation. Afterward medium was subjected to immunoprecipitation with HA-agarose beads for 4 h in the case of  $\Delta$ 334-IL1R2 construct and for 2 h in the case of  $\Delta$ 322-IL1R2 construct. Bound peptides were eluted either with a mixture of 0.3% trifluoroacetic acid, 50% acetonitrile, H<sub>2</sub>O saturated with  $\alpha$ -cyano matrix, or in the case of the IL-1R2 ectodomain with HA peptide (50  $\mu$ g) in 300 mM NaCl for MALDI-TOF analysis (Voyager DESTR, Applied Biosystems) and with 0.1% formic acid, 50% methanol, H<sub>2</sub>O for nanoelectrospray ionization mass spectrometry analysis (Q-STAR Applied Biosystems). MALDI-TOF spectra were recorded in the linear mode and analyzed with Data Explorer<sup>TM</sup> (Applied Biosystems).

For determination of protein identity by mass fingerprinting, the precipitated IL-1R2 was digested with trypsin at 37 °C overnight and analyzed by MALDI-TOF. The obtained peptide fragments were compared with the NCBI data base using Mascot<sup>TM</sup> (Matrix Science). The MALDI-TOF mass spectrometer was either internally calibrated using the masses from tryptic autoproteolysis products or externally using a standard peptide mixture (Sequazyme calibration mixture III, Applied Biosystems). The sequence of the tryptic peptide corresponding to the N terminus of IL-1R2 was determined by direct nanospray infusion of the peptides derived from the tryptic digest and an MS/MS analysis of the doubly charged peptide with an  $m/z$  value of 1036.47 by tandem mass spectrometry using a hybrid quadrupole-time of flight mass spectrometer (Q-STAR, Applied Biosystems). MS/MS spectra were analyzed using BioAnalyst<sup>TM</sup>.

**Deglycosylation of IL-1R2 Ectodomain**—The immunoprecipitated IL-1R2 ectodomain was eluted with HA peptide and subjected to deglycosylation with *N*-glycosidase F from the native deglycosylation kit (Calbiochem) at 37 °C overnight.

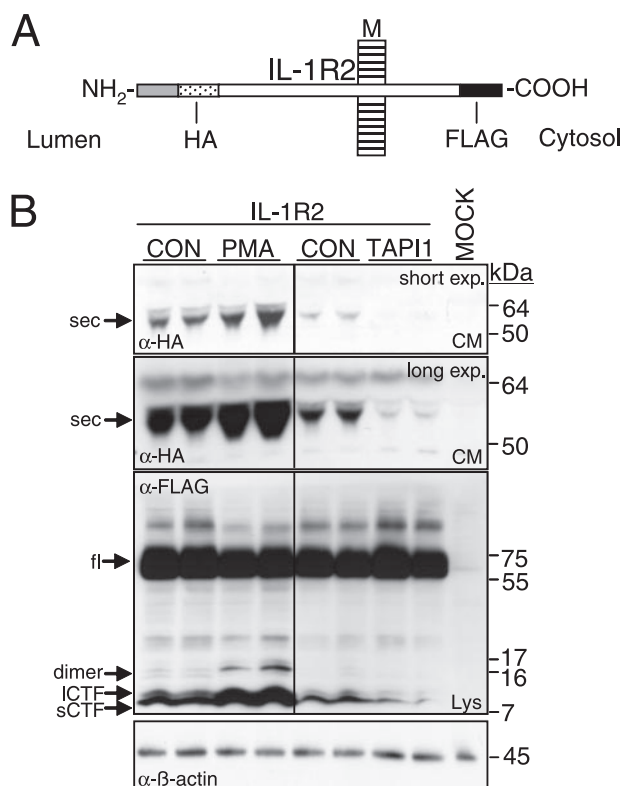
**BACE2 in Vitro Assay with Synthetic Juxtamembrane Region Peptide of IL-1R2**—50 pmol of synthetic peptide spanning from Val-322 to Ser-341 were digested in 50 mM Na<sup>+</sup> acetate buffer, pH 4.4, at different temperatures (e.g. 4 or 37 °C) overnight. For the enzymatic digest, purified BACE2-Fc fusion protein was added to the buffer peptide mixture. For specific inhibition of BACE2, 2  $\mu$ M C3 were added to the incubation mixture. Digested peptides were purified with C18 ZipTip according to the manufacturer's protocol and measured with an ABI Destr in positive reflector mode in a range from 750 to 3000 Da.

**Immunofluorescence of BACE1 and IL-1R2**—COS cells were plated on glass coverslips in 24-well dishes. The next day cells were cotransfected with IL-1R2 and BACE1. 48 h after transfection coverslips were washed two times with ice-cold PBS, fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde/sucrose, and afterward washed again two times with PBS. To clear cells from remaining paraformaldehyde, the cells were washed with 100 mM NH<sub>4</sub>Cl for 3 min. Finally the cells were permeabilized with 1% Triton X-100 for 1 min and again washed two times with ice-cold PBS. After permeabilization cells were double-stained with a polyclonal BACE1 NT antibody and a monoclonal HA antibody (both 1:1000). Cells were washed again and afterward incubated with Alexa 488- (BACE1) and Alexa 594 (IL-1R2)-coupled secondary antibody. Cells were then washed in PBS/water and fixed on a glass specimen with Moviol. Specimens were then investigated under a Zeiss confocal microscope.

## RESULTS

**Shedding of IL-1R2 by a Metalloprotease**—To study the proteolytic processing of IL-1R2, an HA epitope tag was added to the extracellular N terminus after the signal peptide sequence and a FLAG tag to the cytosolic C terminus of the IL-1R2 sequence (Fig. 1A). IL-1R2 was transiently expressed in human embryonic kidney 293-EBNA cells (HEK293). Conditioned medium and cell lysates were separated by gel electrophoresis and analyzed by immunoblot. Compared with mock-transfected cells, the IL-1R2-expressing cells revealed secretion of a 55-kDa fragment (Fig. 1B), which is consistent with the size of IL-1R2 secreted from the human keratinocyte cell line HaCaT (42). This fragment was detected using the anti-HA tag antibody (Fig. 1B) but not the FLAG tag antibody (not shown). Thus, this fragment lacks the C terminus and corresponds to the secreted IL-1R2 ectodomain, which is generated by ectodomain shedding of full-length IL-1R2. Full-length IL-1R2 in the cell lysate was detected with both antibodies (HA and FLAG) at around 65 kDa in the cell lysate (Fig. 1B, shown for the FLAG tag antibody). Upon lower exposure the protein band is a doublet of bands (not shown), which are likely to correspond to immature and to mature, fully glycosylated IL-1R2. Additionally, the FLAG antibody detected smaller IL-1R2 fragments in the cell lysate at around 8, 9, and 16 kDa (Fig. 1B). Because of their size and because they were not detected with the HA antibody, they are likely to be the CTFs, which remain after secretion of the IL-1R2 ectodomain. The 8-kDa fragment (short CTF, sCTF) was present in larger amounts than the longer one of 9 kDa (lCTF). The 16-kDa fragment may be a dimer of the 8-kDa fragment and is mainly visible when larger amounts of the 8-kDa fragment are present (Fig. 1B, PMA-treated samples). The epitope-tagged IL-1R2 was shed in the same manner as described previously for the corresponding untagged wild-type protein (24–26) because the shedding was stimulated by the phorbol ester PMA and inhibited by the metalloprotease inhibitor TAPI-1 (Fig. 1B). PMA and TAPI-1 did not only alter IL-1R2 secretion, but also increased (PMA) or decreased (TAPI-1) the generation of the IL-1R2 CTF (Fig. 1B), indicating that IL-1R2 undergoes proteolytic processing in a metalloprotease-dependent manner at a site close to its transmembrane domain.



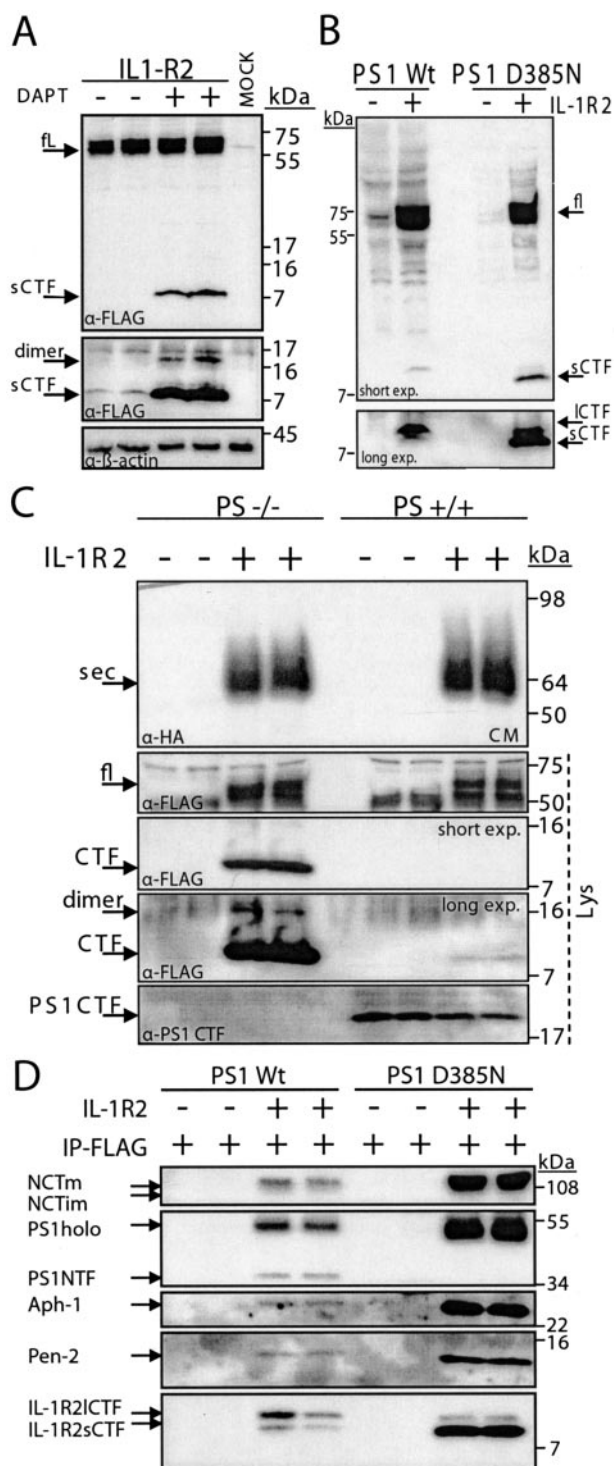


**FIGURE 1. Shedding of IL-1R2 occurs in a metalloprotease-dependent manner.** *A*, schematic drawing of epitope-tagged IL-1R2, which consists of the CD5 signal peptide (gray) followed by an HA epitope tag (dotted), the IL-1R2 coding sequence without its signal peptide (open box), and a C-terminal FLAG tag (black). N and C termini as well as luminal and cytosolic domains are indicated. *M*, membrane. *B*, HEK293 cells were transiently transfected with IL-1R2 or with the peak12 control vector (MOCK). Experiments for IL-1R2 transfected cells are shown as duplicates. For the stimulation of ectodomain shedding, cells were treated for 4 h with ethanol as a control (CON) or with the phorbol ester PMA (1  $\mu$ M). For the inhibition of shedding, cells were pretreated for 45 min and after medium change for another 4 h with Me<sub>2</sub>SO as a control or with the metalloprotease inhibitor TAPI-1 (25  $\mu$ M). *Upper two panels* show different exposure (exp.) times of the same immunoblot, which visualizes secreted (sec) IL-1R2 in the conditioned medium (CM). *Lower panel*, full-length (fl) protein and the C-terminal fragments were detected in the cell lysate (Lys) with the anti-FLAG tag antibody. As a control, treatment with compounds did not affect  $\beta$ -actin levels (bottom panel). The  $\beta$ -actin blot is from a different but equivalent experiment compared with the IL-1R2 immunoblots. Shown are representative blots from three independent experiments.

**IL-1R2 Is a Novel Substrate for  $\gamma$ -Secretase**—Because different type I membrane proteins, including APP and Notch, are first processed by a metalloprotease and then undergo intramembrane proteolysis by  $\gamma$ -secretase, we next tested whether IL-1R2 is also processed within its transmembrane domain. If IL-1R2 is indeed a novel substrate for  $\gamma$ -secretase, its CTF should accumulate in cells lacking active  $\gamma$ -secretase and should no longer be converted to the intracellular domain (ICD) fragment. To test this possibility, three different experimental conditions of  $\gamma$ -secretase inhibition were tested using the following: (*a*) the well characterized  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT (43), (*b*) the dominant-negative and catalytically inactive PS1 D385N mutant (8), and (*c*) PS1/PS2-deficient mouse embryonic fibroblasts. First, HEK293 cells expressing IL-1R2 were treated overnight with or without DAPT. Full-length and CTFs of IL-1R2 were detected in the cell lysate by immunoblot using an antibody against the C-terminal FLAG tag. Compared

with control treated cells, DAPT strongly increased the amount of the IL-1R2 sCTF without increasing full-length IL-1R2 (Fig. 2A). This finding is consistent with  $\gamma$ -secretase cleaving IL-1R2. Interestingly, DAPT did not increase the amount of the ICTF, suggesting that ICTF is either converted to the sCTF and thus does not accumulate or that the ICTF is not significantly processed by  $\gamma$ -secretase. Second, IL-1R2 was transiently transfected into wild-type kidney 293 cells (not the 293-EBNA cell variant) stably expressing wild-type presenilin 1 (PS1) or the dominant-negative PS1 D385N mutant (36). In agreement with a  $\gamma$ -secretase cleavage of IL-1R2, PS1 D385N strongly increased the amount of short IL-1R2 sCTF compared with wild-type PS1-expressing cells (Fig. 2B). As in Fig. 2A, the ICTF did not accumulate significantly but was generally more clearly detected than in the other figures, where the slightly different HEK293-EBNA cell variant (Fig. 2A) and the fibroblasts (Fig. 2C) were used. Third, compared with wild-type mouse embryonic fibroblasts, retroviral transduction of IL-1R2 into fibroblasts deficient in PS1 and PS2 resulted in accumulation of the IL-1R2 CTF (Fig. 2C, 3rd and 4th panels). Similar to Figs. 1B and 2A, mainly the sCTF was visible. The amount of full-length and secreted IL-1R2 showed no major differences between both cell types. As expected, PS1 was only detected in wild-type but not in PS1/PS2-deficient cells (Fig. 2C, bottom panel shows the PS1 CTF). Additionally, a possible interaction between the IL-1R2 CTF and the  $\gamma$ -secretase complex was tested in a coimmunoprecipitation experiment. To this aim IL-1R2 was expressed in HEK293 cells stably expressing the  $\gamma$ -secretase subunit presenilin 1 in the wild-type (WT) or in the catalytically inactive D385N form. Immunoprecipitation of the IL-1R2 C-terminal fragment led to coprecipitation of all four  $\gamma$ -secretase complex subunits nicastrin, presenilin 1, Aph-1, and Pen-2 (Fig. 2D). As expected, more  $\gamma$ -secretase subunits were precipitated in the catalytically inactive PS1 D385N cells compared with the PS1 WT cells. Together, these experiments are consistent with IL-1R2 CTF being a novel substrate for  $\gamma$ -secretase-mediated intramembrane proteolysis.

As a result of  $\gamma$ -secretase cleavage, the IL-1R2 CTF should be converted to the ICD fragment. As above, generation of this fragment should be inhibited when  $\gamma$ -secretase cleavage is blocked. Similar to what is known for the APP ICD (44), the IL-1R2 ICD may be short lived and could not be seen in the cultured cells under steady state conditions (see above Figs. 1 and 2). Thus, an established *in vitro*  $\gamma$ -secretase cleavage assay (41) was used for the detection of the IL-1R2 ICD. IL-1R2 was transiently transfected into HEK293 cells. The cells were additionally treated with PMA, which results in increased ectodomain shedding of IL-1R2 and in an increased amount of IL-1R2 CTFs (Fig. 1B), which can serve as substrates for subsequent  $\gamma$ -cleavage. Membranes from these cells containing full-length IL-1R2 and CTFs were incubated for 2 h at 37 °C. This resulted in the generation of the ICD of IL-1R2, which was released from the membrane and found in the supernatant after ultracentrifugation (Fig. 3A, bottom panel). Addition of the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT or incubation at 4 °C prevented ICD generation (Fig. 3A). As an additional control, a further *in vitro* cleavage assay was carried out, in which an N-terminally truncated form of IL-1R2 was expressed. This mutant protein lacks most



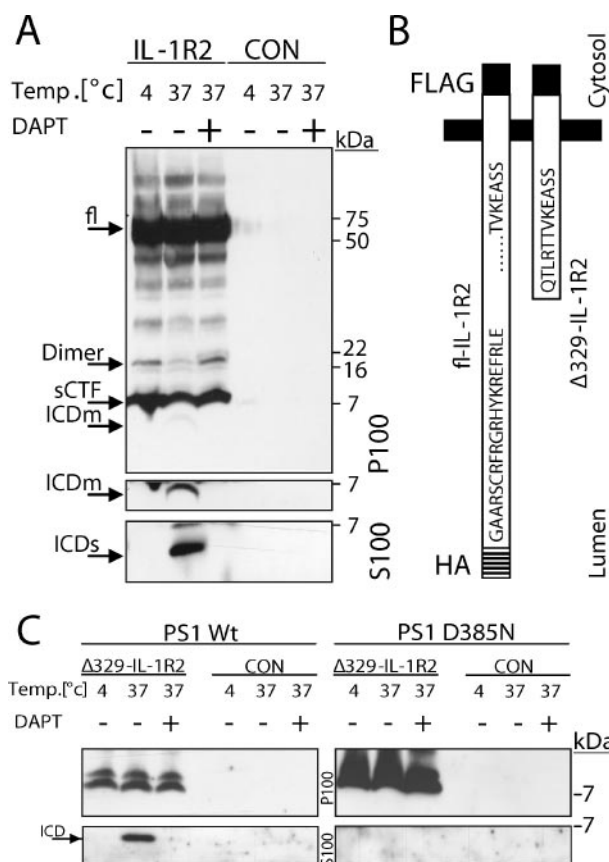
**FIGURE 2. Inhibition of  $\gamma$ -secretase leads to an accumulation of IL-1R2 C-terminal fragments.** A, HEK293 cells were transiently transfected with IL-1R2 or with peak12 control vector (MOCK) as in Fig. 1. Cells were treated overnight with Me<sub>2</sub>SO as a control or with the highly specific  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT (1  $\mu$ M). Experiments for IL-1R2 were carried out in duplicate. The anti-FLAG tag antibody was used to detect full-length (fl) proteins and their C-terminal fragments in the immunoblot. The short CTF of IL-1R2 in the control treated cells is visible upon longer exposure of the blot (middle panel). As a control, treatment with DAPT did not affect  $\beta$ -actin levels (bottom panel). B, HEK293 cells stably expressing wild-type PS1 (PS1 Wt) or a dominant-negative PS1 mutant (PS1 D385N) were transiently transfected with control vector or with IL-1R2 as indicated above the blot. Full-length (fl) IL-1R2 and its CTFs (sCTF and ICTF) were detected using the anti-FLAG tag antibody. In these cells, the ICTF is more clearly detected than in the cell lines in the other panels.

of the ectodomain ( $\Delta$ 329-IL-1R2; Fig. 3B) and corresponds approximately to the IL-1R2 CTF generated by the PMA-inducible metalloprotease cleavage. Truncated forms of  $\gamma$ -secretase substrates, such as C99 derived from APP (45) and Notch $\Delta$ E derived from Notch (46), can directly be cleaved by  $\gamma$ -secretase and do not need to undergo ectodomain shedding.  $\Delta$ 329-IL-1R2 was transiently transfected into HEK293 cells expressing wild-type PS1 or the dominant-negative PS1 D385N mutant. Membranes were prepared and treated in the  $\gamma$ -secretase *in vitro* assay as above. Generation of the IL-1R2 ICD was detected in the PS1 WT but not in the PS1 D385N-expressing cells and was also absent in the PS1 WT cells, when treated with the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT or when incubated at 4 °C (Fig. 3C).  $\Delta$ 329-IL-1R2 was detected as a doublet band in the membrane fraction. Taken together, these experiments demonstrate that IL-1R2 is a novel substrate for  $\gamma$ -secretase.

**Identification of the  $\gamma$ -Secretase Cleavage Site by Mass Spectrometry**—Besides ICD generation,  $\gamma$ -secretase cleavage is expected to generate a soluble N-terminal peptide derived from IL-1R2, which we refer to as IL-1R2 $\beta$ -peptide in analogy to the APP-derived A $\beta$  peptide and the Notch-derived N $\beta$  peptide (47). To determine the cleavage site of  $\gamma$ -secretase within the IL-1R2 transmembrane domain,  $\Delta$ 334-IL-1R2 was expressed in HEK293 cells. Compared with  $\Delta$ 329-IL-1R2, this mutant has an HA tag at the N terminus (Fig. 4A), which was used to immunoprecipitate the IL-1R2 $\beta$ -peptide from the conditioned medium. MALDI-TOF mass spectrometry analysis revealed three major peptide species and several minor peptides (Fig. 4B). All peptides were generated in a  $\gamma$ -secretase-dependent manner, because the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT blocked their generation. As expected, none of the peptides was visible in control transfected cells. The peptide peak at 3678 Da corresponds to a cleavage site between Ser-353 and Leu-354 in the middle of the transmembrane domain (Fig. 4, A and C). An additional fragment of 3197 Da indicates a cleavage site between Val-348 and Leu-349 in the N-terminal half of the transmembrane domain. The shortest peptide with a mass of 2507 Da corresponds to a cleavage site at the very N terminus or just outside of the IL-1R2 transmembrane domain. Alternatively, the two shorter peptides at 3197 and 2507 Da may arise through C-terminal truncation of the longer peptide at 3678 Da. The masses of the additional minor peptide peaks correspond exactly to C-terminally truncated peptides with regard to the peptide peaks at 3197 and 3678 Da. Thus, the mass spectrometric analysis shows that, like APP and other  $\gamma$ -secretase substrates, IL-1R2 is cleaved by  $\gamma$ -secretase within its transmem-

The lower panel shows a longer exposure of the blot above. C, mouse embryonic fibroblasts from wild-type mice (PS<sup>+/+</sup>) or from PS1 and PS2 double-deficient mice (PS<sup>-/-</sup>) were transduced with retroviruses encoding epitope-tagged IL-1R2. Nontransduced cells served as controls for the specificity of the IL-1R2 bands. Secreted (sec) IL-1R2 in the supernatant (upper panel) as well as full-length (fl) IL-1R2 (2nd panel from top) and its C-terminal fragments (3rd and 4th panels from top, showing different exposure times) were detected by immunoblot using antibodies against the indicated epitope tags. The PS1 CTF was only detected in wild-type (PS<sup>+/+</sup>), but not in PS-deficient (PS<sup>-/-</sup>) cells (bottom panel). Shown are representative blots from three independent experiments. D, HEK293 cells stably expressing either PS1 WT or PS1 D385N were transduced with the same construct as in C. IL-1R2 CTFs were immunoprecipitated from the lysate and analyzed for IL-1R2 CTF as well as for coprecipitated  $\gamma$ -secretase components nicastrin, PS1 NTF, Aph-1, and Pen-2.





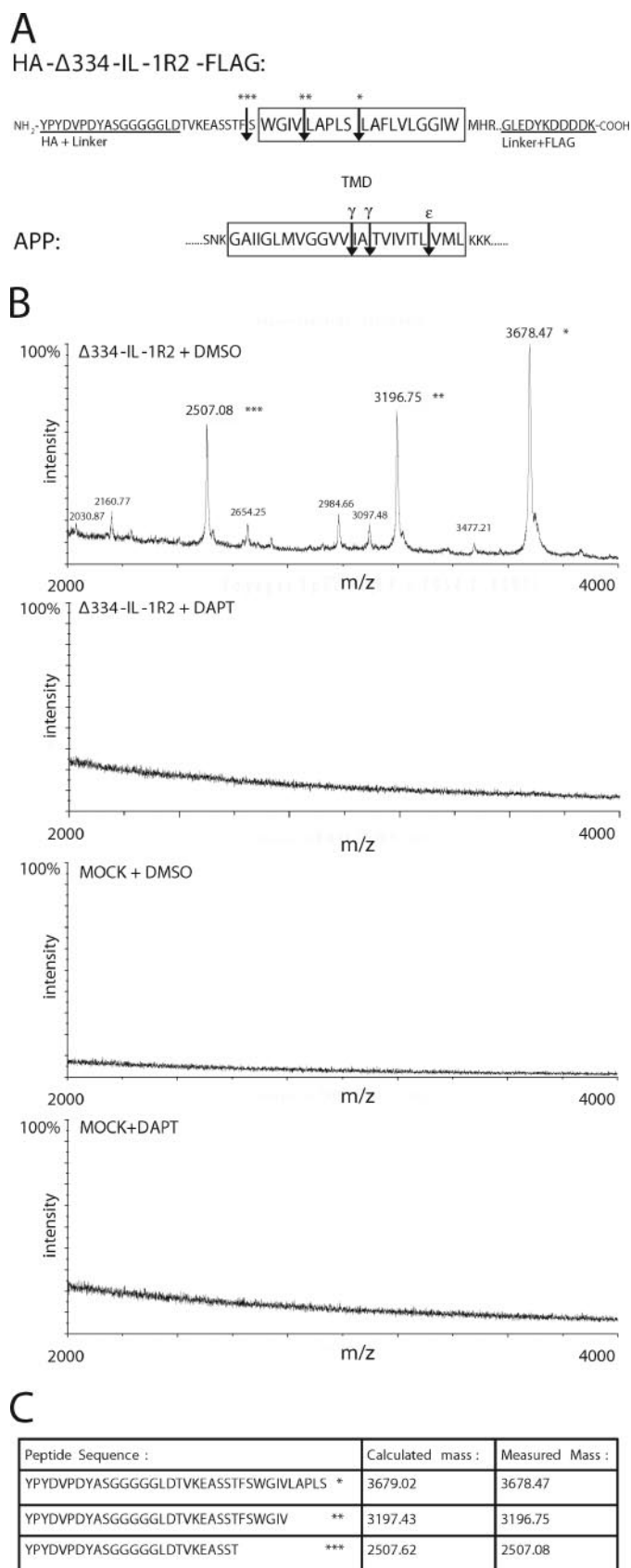
**FIGURE 3. *In vitro*  $\gamma$ -secretase assay generates IL-1R2 intracellular domain.** A, HEK293 cells were transiently transfected with the IL-1R2 expression vector or with control (CON) vector. Cells were treated for 4 h with the phorbol ester PMA (1  $\mu$ M). Membrane preparations of the cells were incubated for 2 h at 4 or 37 °C (indicated above the blots) with or without the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT (1  $\mu$ M). Supernatants (S100) and pellets (P100) of a 100,000  $\times$  g ultracentrifuge spin were analyzed with an antibody against the C-terminal FLAG-epitope tag. Full-length (fl) IL-1R2 and CTFs were found in the membrane-bound pellet fraction, whereas the intracellular domain was mainly seen in the soluble fraction (ICDs). Low amounts of ICD were also detected in the membrane fraction (ICD<sub>m</sub>). Middle panel shows a longer exposure of upper panel. B, schematic drawing of epitope-tagged full-length (fl) IL-1R2 and the deletion mutant lacking a large part of the ectodomain. Constructs are not drawn to scale. The IL-1R2 expression constructs consist of an N-terminal HA epitope tag (black lines; not present in  $\Delta$ 329-IL-1R2) and a C-terminal FLAG tag (black). Construct number 329 indicates the starting amino acid relative to the HA-IL-1R2-FLAG sequence. C, HEK293 cells stably expressing wild-type PS1 (PS1 Wt) or the dominant-negative PS1 D385N mutant (PS1 D385N) were transiently transfected with  $\Delta$ 329-IL-1R2 or with control vector (CON). Membrane preparations were incubated for 3 h at the same temperatures and inhibitor conditions as in A. Upper panel shows that  $\Delta$ 329-IL-1R2 is found in the membrane-bound pellet fraction after ultracentrifugation (P100), whereas the soluble ICD resulting from  $\gamma$ -secretase cleavage is found in the supernatant (S100). Detection was carried out using the FLAG antibody. Shown are representative blots from three independent experiments.

brane domain. A potential additional  $\epsilon$ -cleavage at the C-terminal end of the transmembrane domain was not investigated.

**BACE1 and BACE2 Increase Secretion of IL-1R2**—Because of the similarities of proteolytic processing between IL-1R2 and APP, we next tested whether IL-1R2 may also be a substrate for BACE1 or BACE2. To this aim, IL-1R2 and either control vector or BACE1 or BACE2 were transiently transfected into HEK293 cells. As a control, we verified that expression of both proteases increased secretion of APP (data not shown). Full-

length IL-1R2 and its proteolytic fragments were detected using antibodies against the N-terminal HA epitope tag or against the C-terminal FLAG tag. Expression of BACE1 and BACE2 increased IL-1R2 secretion and the generation of the corresponding IL-1R2 CTFs in the cell lysate (Fig. 5A, a short and a long exposure are shown for the CTF blot). This was paralleled by a decrease in the amount of full-length IL-1R2 in the cell lysate, suggesting that IL-1R2 can be cleaved by BACE1 and BACE2. Interestingly, although expression of BACE1 and BACE2 increased the proteolytic processing of IL-1R2, it did not change the apparent molecular weight of the cleavage products (secreted IL-1R2 and CTFs) (Fig. 5A). Because this is the same size as the fragments, which were generated in the PMA-inducible metalloprotease-dependent manner (Fig. 1B), this result suggests that the BACE1 and BACE2 cleavage sites in IL-1R2 are located very close to the metalloprotease cleavage site. Next, we tested whether IL-1R2 processing was reduced in murine primary hippocampal neurons lacking BACE1 or in glial cells deficient in both BACE1 and BACE2. However, no change in the amount of secreted IL-1R2 or in the amount of the IL-1R2 CTF was detected between the wild-type cells and the knockout cells (data not shown). Potentially, in the absence of BACE1 or BACE2 IL-1R2 may undergo increased cleavage by a metalloprotease. The use of the metalloprotease inhibitor TAPI-1 did not significantly alter IL-1R2 processing in the BACE-deficient cells (not shown), presumably because the inhibitor is not potent enough to fully block CTF generation under wild-type conditions (see Fig. 1B). As a consequence of the BACE deficiency, no changes in IL-1R2 processing may be observed, because BACE1/BACE2 and the metalloprotease lead to IL-1R2 cleavage products of the same apparent molecular weight. This is different from APP and PSGL-1, which are both cleaved by BACE1 in such a distance from the metalloprotease cleavage site that the CTFs resulting from these cleavage events can be clearly separated by gel electrophoresis. As a consequence the BACE1-induced CTF, but not the metalloprotease-induced CTF of APP and PSGL-1, was absent in BACE1-deficient cells as we and others have shown previously (32, 48).

To exclude the possibility that transfection of BACE1 or BACE2 increased IL-1R2 shedding simply by activating the  $\alpha$ -secretase-like metalloprotease cleavage, we tested the following: (a) whether the metalloprotease inhibitor TAPI-1 is able to reduce the BACE1-induced increase in IL-1R2 shedding, (b) whether BACE1 and IL-1R2 colocalize in transfected cells, and (c) whether BACE2 is able to cleave *in vitro* a synthetic peptide encompassing the juxtamembrane domain of IL-1R2. First, HEK293 cells were transfected with IL-1R2 and either BACE1 or empty vector as a control. Treatment with the metalloprotease inhibitor TAPI-1 largely inhibited IL-1R2 shedding under control conditions (Fig. 5B, see also Fig. 1B) but did not significantly reduce the increased IL-1R2 shedding in the BACE1-transfected cells. Addition of the specific BACE inhibitor C3 (49, 50) was able to reduce the increased IL-1R2 shedding in the BACE1-transfected cells. This shows that BACE1 transfection did not indirectly increase IL-1R2 shedding by stimulating the  $\alpha$ -secretase-like cleavage. Second, immunofluorescence microscopy was used to test for a colocalization between BACE1 and IL-1R2 in transfected COS cells, which are large

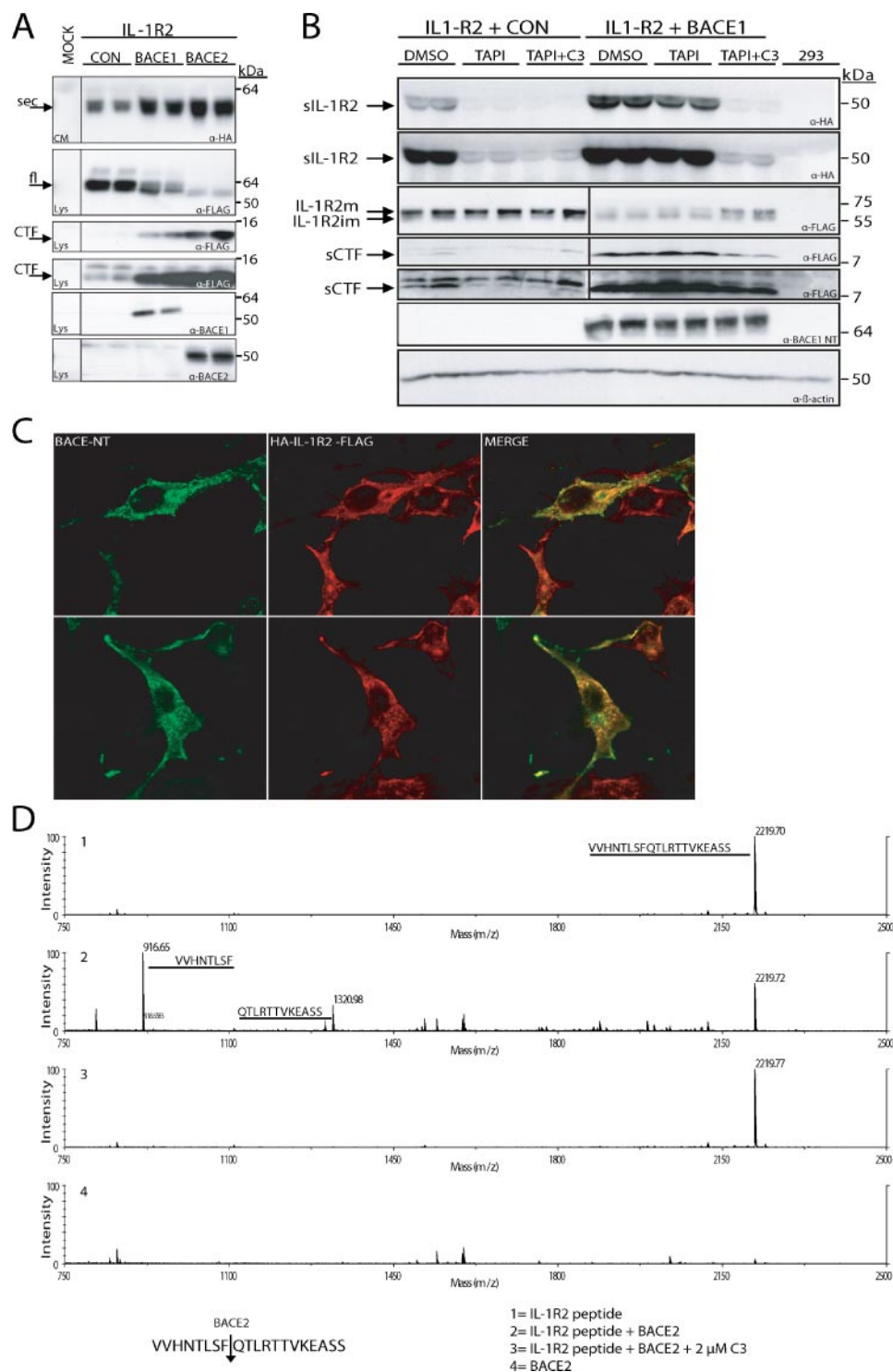


**FIGURE 4. Determination of  $\gamma$ -secretase cleavage site by mass spectrometry.** A, schematic drawing of the sequence of the  $\Delta$ 334-IL-1R2 construct. \*, \*\*, and \*\*\* indicate the C termini of the peptides identified in B. Additional but minor peptide peaks were observed, which can be assigned to C-terminally

and adherent and thus allow good visualization of the cellular localization of both proteins. Colocalization was observed at or close to the plasma membrane, in vesicular structures, and at perinuclear sites (Fig. 5C), which agrees with the intracellular localization of BACE1 observed in other studies (48, 51, 52). Third, an Fc fusion protein of BACE2 was purified and incubated at 37 °C *in vitro* with a synthetic peptide encompassing the juxtamembrane domain of IL-1R2. This domain was previously shown to be required for IL-1R2 secretion (42). Generation of the cleavage products was monitored by mass spectrometry (Fig. 5D). The intact peptide incubated without BACE2 showed the expected mass of 2219.7 Da (Fig. 5D). Incubation with BACE2 resulted in the formation of two smaller fragments with masses of 916.7 and 1321 Da, revealing a cleavage between Phe-329 and Gln-330 (Fig. 5D). The fragment peaks were not observed when BACE2 was incubated in the absence of the peptide, showing the specificity of the peptide fragment peaks. Importantly, the specific BACE protease inhibitor C3 (Fig. 5D) as well as incubation at 4 °C (not shown) completely inhibited the peptide cleavage. Together, these experiments indicate that IL-1R2 can be directly cleaved by BACE1 and BACE2.

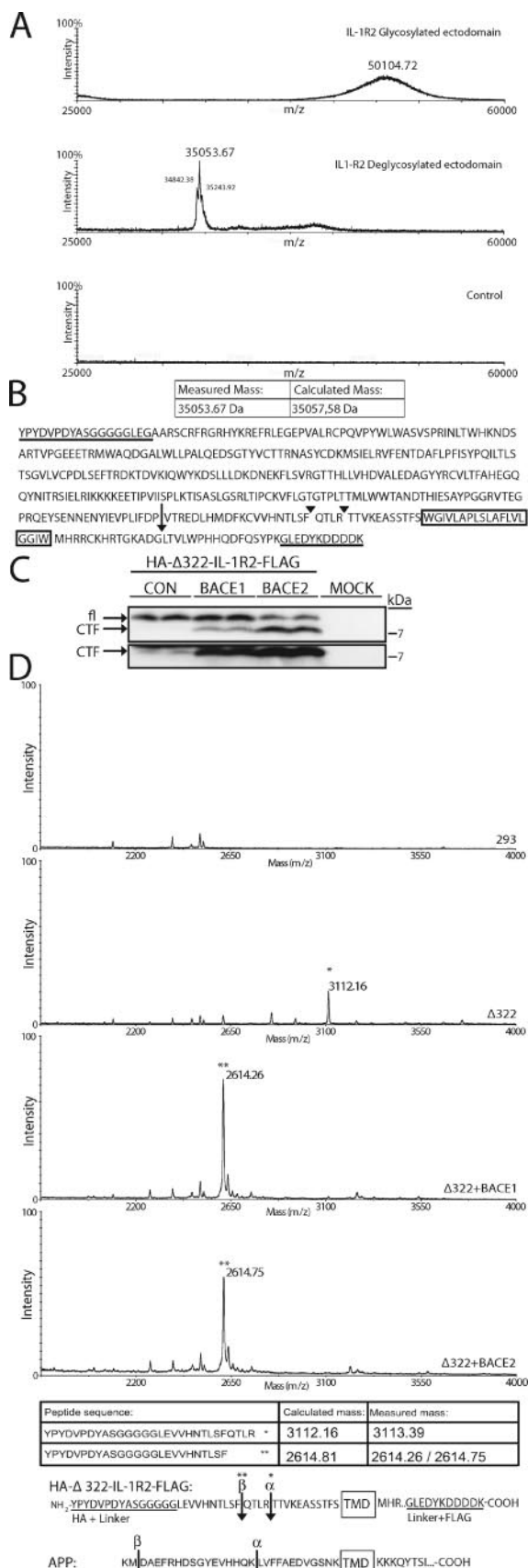
**Mass Spectrometric Determination of the BACE1 and BACE2 Cleavage Sites in Cultured Cells**—Next, we tested whether the BACE protease cleavage site in IL-1R2 observed *in vitro* was also found in IL-1R2-expressing HEK293 cells. First, the mass of the secreted IL-1R2 ectodomain was measured to determine its C-terminal amino acid. The IL-1R2 ectodomain was immunoprecipitated from PMA-treated HEK293 cells. PMA treatment increases IL-1R2 secretion (Fig. 1B) and allows the purification of sufficient amounts of the IL-1R2 ectodomain for linear mode MALDI-TOF mass spectrometric analysis. This revealed a broad peak at around 50 kDa (Fig. 6A), which fits well with the apparent molecular mass of around 55 kDa in the immunoblot (Fig. 1B). Because IL-1R2 contains five potential *N*-glycosylation sites within its ectodomain, the immunoprecipitated ectodomain was treated with *N*-glycosidase F to remove the *N*-linked sugars. This resulted in a sharper mass peak at 35 kDa (Fig. 6A). This peak was specific to IL-1R2 because it was not present in the medium of control transfected cells, which did not express IL-1R2. Additionally, a tryptic digest of this 35-kDa fragment and a subsequent analysis of the N-terminal peptide by tandem mass spectrometry revealed the N terminus to start with the tyrosine residue of the N-terminal HA tag (not shown), which remains after signal peptide cleavage. If no other post-translational modifications are present, the 35-kDa peak is consistent with the C terminus of the IL-1R2 ectodomain ending in amino acid proline 309 at a distance of 35 amino acids from the membrane (Fig. 6B, marked with an arrow; measured mass 35,053.67 Da; calculated mass 35,057.58

truncated forms of peptides \* and \*\*. Sequence of the transmembrane domain is boxed. For a comparison, the transmembrane sequence of APP and the corresponding  $\gamma$ - and  $\epsilon$ -secretase cleavage sites are indicated. B, HEK293 cells were transiently transfected with  $\Delta$ 334-IL-1R2 (upper two panels) or control vector (MOCK, lower two panels) and additionally treated with Me<sub>2</sub>SO as a control or with the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT. Supernatant was immunoprecipitated with HA-agarose beads. Peptide masses were determined by mass spectrometry using MALDI-TOF. C, list of identified peptides and their deviation from the theoretical mass calculated with GPMW (Lighthouse).



**FIGURE 5. BACE1 and BACE2 increase processing of IL-1R2.** *A*, HEK293 cells were transiently transfected with control vector (*MOCK*) or with the epitope-tagged IL-1R2 (a short and a long exposure of the CTF blot are shown) as indicated **above** the blots. Cells were cotransfected as indicated with empty vector as a control (*CON*), BACE1 or BACE2 in duplicate experiments. Conditioned media (*CM*) and cell lysates (*Lys*) were separated by gel electrophoresis. Proteins were detected with the indicated antibodies. *Vertical lines* on the blot indicate that the samples were run on the same gel but not directly next to each other. *B*, HEK293 cells were transfected as in *A*. Cells were pretreated for 45 min and after medium change for another 4 h either treated with  $\text{Me}_2\text{SO}$  (*DMSO*) as control or the metalloprotease inhibitor TAPI-1 (25  $\mu\text{M}$ ) or with TAPI-1 (25  $\mu\text{M}$ ) plus the BACE inhibitor C3 (2  $\mu\text{M}$ ). Two different exposure times of the sIL-1R2 and the sCTF blots are shown. Note that TAPI-1 reduces IL-1R2 secretion in the control cells (*left 6 lanes*) but not in the BACE1-transfected cells. The BACE inhibitor C3 can slightly further reduce IL-1R2 secretion when coincubated with TAPI-1 in control cells. As a control, treatment with compounds did not affect  $\beta$ -actin levels (*bottom panel*). *Vertical lines* on the blot indicate that the samples were run on different gels. *C*, COS cells were transiently transfected with IL-1R2 and BACE1 and stained for IL-1R2 (*red*) and BACE1 (*green*). Confocal fluorescence microscopy reveals plasma membrane, vesicular, and perinuclear colocalization of IL-1R2 and BACE1. *D*, an IL-1R2 juxtamembrane peptide encompassing amino acids 322–341 was incubated with a BACE2-Fc fusion protein *in vitro* in an acidic sodium acetate buffer under different conditions: 1, incubation of peptide alone; 2, peptide plus BACE2-Fc; 3, peptide plus BACE2-Fc plus BACE inhibitor C3; 4, BACE2-Fc alone. Peptide and fragments were purified and analyzed by mass spectrometry. Peptide sequence and identified cleavage site are indicated *below* the spectra.





**FIGURE 6. Determination of the BACE1 and BACE2 cleavage sites in HEK293 cells.** A, HA-agarose beads were used to immunoprecipitate secreted IL-1R2 from the conditioned medium of PMA-treated IL-1R2-expressing HEK293 cells and

Da). This site is several amino acids more N-terminal than the cleavage site determined in the *in vitro* BACE2 assay (Fig. 5D). Potentially, the initial cleavage occurs at Phe-329 and is then followed by carboxypeptidase cleavage (see "Discussion"). Next, to reduce the potential carboxypeptidase trimming of the ectodomain, the serum concentration was reduced from 10 to 1%, and the incubation time of the conditioned medium was reduced from overnight incubation to 4 h. Additionally, a truncated IL-1R2 construct ( $\Delta$ 322-IL-1R2) was used. This protein lacks most of the IL-1R2 ectodomain but retains the juxtamembrane cleavage region, which is required for secretion (42), and was used in the *in vitro* assay and also encodes the transmembrane and cytoplasmic domains of IL-1R2 (Fig. 6, C and D). Thus,  $\Delta$ 322-IL-1R2 is similar to N-terminally truncated APP constructs, which, like full-length APP, are cleaved by  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase.  $\Delta$ 322-IL-1R2 and either control vector BACE1 or BACE2 were cotransfected into HEK293 cells. A strong increase in the formation of IL-1R2 CTFs was observed in the BACE1- and BACE2-expressing cells compared with the control cells (Fig. 6C). These CTFs had the identical apparent molecular weight as the CTFs generated from full-length IL-1R2 (not shown), revealing that cleavage of the truncated  $\Delta$ 322-IL-1R2 occurs in the same manner as for full-length IL-1R2. The secreted short ectodomain of  $\Delta$ 322-IL-1R2 was immunoprecipitated from the conditioned medium and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Cells expressing  $\Delta$ 322-IL-1R2 (but not transfected with BACE1 or BACE2) secreted a peptide with a mass of 3112.2 Da, which was not present in control transfected cells not expressing  $\Delta$ 322-IL-1R2. Because these cells were not transfected with BACE1 or BACE2, this peptide is likely to result from the metalloprotease cleavage and corresponds to a cleavage between Arg-333 and Thr-334. Additional minor peaks were observed at lower masses and correspond to C-terminally truncated peptides. They may arise through alternative proteolytic cleavages or because of the remaining low level carboxypeptidase activity. Transfection of BACE1 and BACE2 led to a strong increase in the generation of a peptide with a mass of 2614 Da, which corresponds to a cleavage between Phe-329 and Gln-330. This site is identical to the one determined in the *in vitro* BACE2 cleavage assay. The metalloprotease generated fragment (3112 Da) was only visible at low amounts. This analysis indicates that the

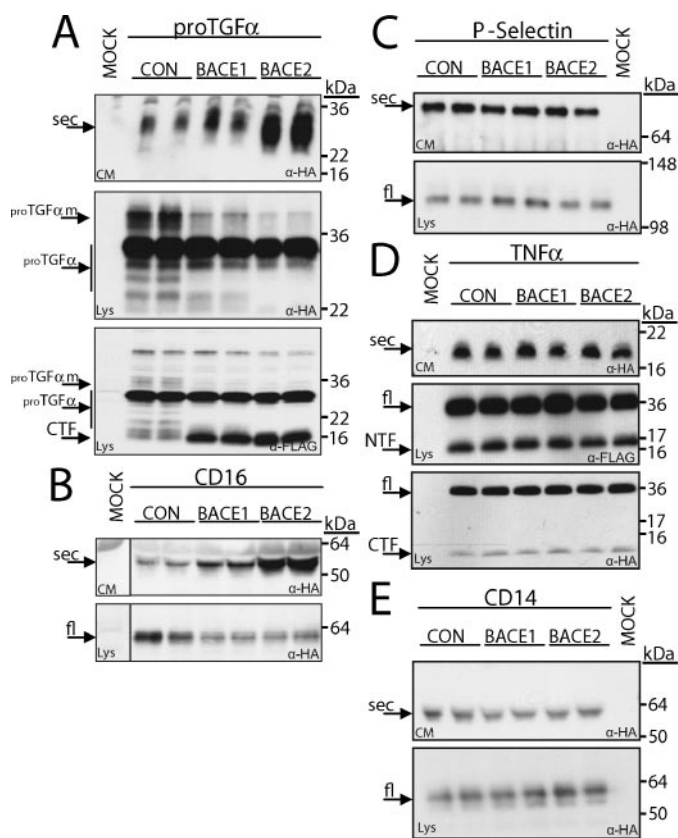
either left untreated (upper panel) or deglycosylated with N-glycosidase F (middle panel). MALDI-TOF mass spectrometric analysis was used to determine the mass of the precipitated fragment. No peptides were detected in the medium of mock-transfected control cells (lower panel). B, sequence of epitope-tagged IL-1R2. The N-terminal HA tag plus a linker sequence as well as the C-terminal linker sequence plus the FLAG tag are underlined. The transmembrane domain is boxed. The putative C terminus of the secreted ectodomain is marked by an arrow. The putative cleavage sites by the metalloprotease and BACE1 and BACE2 as determined in D are indicated with arrowheads. C, HEK293 were transfected with empty vector (MOCK) or cotransfected with  $\Delta$ 322-IL-1R2 and either empty vector or BACE1 or BACE2. Full-length (fl)  $\Delta$ 322-IL-1R2 and CTFs (two different exposure times) are seen in immunoblot using an antibody against the C-terminal FLAG tag. D, immunoprecipitated supernatants of 293E cells expressing  $\Delta$ 322-IL-1R2 either with empty vector or BACE1 or BACE2 were subjected to MALDI-TOF MS. Measured and calculated masses are compared in the table below the spectra. The resulting cleavage sites are indicated in the schematic figure of  $\Delta$ 322-IL-1R2 and compared with cleavage sites of  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase in case of APP. Asterisks indicate the  $\beta$ - and  $\alpha$ -secretase-like cleavage sites in  $\Delta$ 322-IL-1R2.

metalloprotease cleavage site and the BACE1/BACE2 cleavage sites in IL-1R2 are indeed very close to each other, at a distance of four amino acids.

**BACE1 and BACE2 Selectively Enhance Secretion of a Subset of Shedding Substrates**—To rule out the possibility that transfected BACE1 and BACE2 simply increased the cleavage of any shedding substrate, including IL-1R2, five additional membrane proteins were tested for their potential cleavage by both proteases. Pro-TGF $\alpha$  (converted to soluble TGF $\alpha$  upon shedding) and the cell adhesion protein P-selectin are type I membrane proteins, the lipopolysaccharide receptor CD14, and the Fc $\gamma$  receptor CD16 are GPI-anchored proteins, and TNF $\alpha$  is a type II membrane protein. Like APP and IL-1R2, all proteins undergo ectodomain shedding in a metalloprotease-dependent manner and can be found in soluble form in physiological body fluids (53, 54). The proteins were tagged with an HA epitope tag in their extracellular domain. The three type I and II membrane proteins (pro-TGF $\alpha$ , P-selectin, and TNF $\alpha$ ) were additionally tagged with a FLAG tag in their intracellular cytoplasmic domain. Transient transfection of these constructs together with control vector, BACE1, or BACE2 was carried out as above for APP and IL-1R2. The full-length and secreted forms of all proteins were detected in the cell lysate and the conditioned medium, respectively, at their expected apparent molecular weight (Fig. 7, A–E). BACE1 and BACE2 increased the secretion and reduced the cellular levels of pro-TGF $\alpha$  (Fig. 7A) and of CD16 (Fig. 7B) but not of P-selectin, TNF $\alpha$ , and CD14 (Fig. 7, C–E), revealing that both proteases do not cleave all membrane proteins undergoing ectodomain shedding. Moreover, for pro-TGF $\alpha$  an increase in the CTFs was detected in the cell lysate (Fig. 7A), which is consistent with a proteolytic cleavage very close to the membrane domain. Similar to IL-1R2, the BACE1- and BACE2-induced CTFs of pro-TGF $\alpha$  had a very similar apparent molecular weight as the CTFs observed under control conditions (Fig. 7A). Because CD16 is a GPI-anchored protein, no CTFs were observed in the lysate. Expression of transfected BACE1 and BACE2 was verified by immunoblot (not shown).

## DISCUSSION

Several type I membrane proteins undergo RIP, which is a proteolytic cascade initiated by metalloprotease-mediated ectodomain shedding and followed by  $\gamma$ -secretase-dependent intramembrane proteolysis. Among these proteins, only APP is additionally subject to ectodomain shedding by the  $\beta$ -secretase BACE1 and its homolog BACE2. Thus, APP serves as a good reference for the study of the proteolytic processing of type I membrane proteins. Processing of APP is a key event in the pathogenesis of AD. Proteolytic processing of another membrane protein, the IL-1R2, has also been linked to AD. In particular, increased amounts of the secreted IL-1R2 ectodomain have been detected in the cerebrospinal fluid of patients with an early stage but not a late stage of AD compared with age-matched controls (22, 23). In agreement with previous studies (24–26), we found that shedding of IL-1R2 shows the typical features of a protein undergoing  $\alpha$ -secretase-like ectodomain shedding by an ADAM protease. IL-1R2 shedding could be stimulated with the phorbol ester PMA and could be blocked by the metalloprotease inhibitor TAPI-1. By using mass spectrom-



**FIGURE 7. Expression of BACE1 and BACE2 stimulates secretion of TGF $\alpha$  and CD16.** HEK293 cells were transiently transfected with control vector (MOCK) or with the epitope-tagged expression constructs of the following: A, pro-TGF $\alpha$ ; B, CD16; C, P-selectin; D, TNF $\alpha$ ; and E, CD14 as indicated above the blots. Cells were cotransfected as indicated with empty vector as a control (Con), BACE1 or BACE2 in duplicate experiments. Conditioned media (CM) and cell lysates (Lys) were separated by gel electrophoresis. Proteins were detected with the indicated antibodies. Shown are representative blots of at least three independent experiments. pro-TGF $\alpha$ m, mature form of pro-TGF $\alpha$ ; sec, secreted form of protein; fl, full-length. Vertical lines on the blot indicate that the samples were run on the same gel but not directly next to each other.

etry we found that the  $\alpha$ -secretase-like cleavage site is located in the membrane-proximal stalk region of IL-1R2. The ectodomain has proline 309 as a C-terminal residue, whereas the truncated  $\Delta$ 322-IL-1R2 has Arg-333 as a C-terminal amino acid. This could indicate that there are two different cleavage sites for the metalloprotease. However, we assume that the initial cleavage site is at Arg-333 and that the ectodomain is then trimmed, potentially by a carboxypeptidase, until proline 309. In fact, carboxypeptidases cleave inefficiently at proline residues (55) and thus may not be able to further trim the C terminus beyond proline 309. Moreover, a previous study (42) would agree well with a cleavage at amino acid 332 but not at 309. That study replaced amino acids His-324 through Ser-341 in the membrane-proximal domain of IL-1R2 by the corresponding residues of the epidermal growth factor receptor membrane-proximal domain, and they found that this mutation prevented normal secretion of the IL-1R2 ectodomain (42). Additionally, the APP  $\alpha$ -cleavage is strongly reduced by a proline mutation close to the cleavage site (56, 57), suggesting that metalloprotease-mediated ectodomain shedding occurs in helical conformations, making it unlikely that the  $\alpha$ -like cleavage in IL-1R2 occurs directly at proline 309. Interestingly, APP is cleaved

C-terminally to a lysine residue and IL-1R2 C-terminally to an arginine, suggesting a preference of the  $\alpha$ -secretase-like cleavages for a positively charged residue.

The CTF, which is generated upon ectodomain shedding of full-length IL-1R2, can be further cleaved by  $\gamma$ -secretase. Using different experimental approaches, including a  $\gamma$ -secretase inhibitor and cells deficient in  $\gamma$ -secretase activity, we demonstrate that IL-1R2 is a novel  $\gamma$ -secretase substrate. This fits well with the general idea that the CTFs of type I membrane proteins, which undergo ectodomain shedding, are subsequently further cleaved by  $\gamma$ -secretase, leading to the release of their ICD.  $\gamma$ -Secretase cleavage of CTFs and generation of the ICD may serve different purposes, including signal transduction and membrane protein degradation (2). Similar to APP, the physiological role of  $\gamma$ -cleavage of IL-1R2 remains unknown. It may be a degradation pathway for the IL-1R2 CTF. Alternatively, it may allow the IL-1R2 ICD to participate in a new kind of signal transduction, similar to Notch.

An additional outcome of our study is that transfection of the  $\beta$ -secretase BACE1 and its homolog BACE2 can stimulate secretion of IL-1R2 and generation of its CTFs. As determined by mass spectrometry, the cleavage occurs C-terminally to a phenylalanine, which agrees well with the known cleavage specificity of BACE1 and BACE2. Both proteases preferentially cleave after hydrophobic residues, such as leucine in the Swedish mutant form of APP, in PSGL-1, and ST6Gal I or after methionine in wild-type APP (32, 58–60).

If IL-1R2 is also cleaved at endogenous expression levels of BACE1 and BACE2 and thus constitutes a novel substrate for both proteases, its cleavage should be reduced in BACE1 or -2 knock-out cells, which, however, was not the case. This is in contrast to other established substrates for both proteases, such as APP (39, 61–63), PSGL-1 (32), the sialyltransferase ST6Gal I (64),  $\beta$ -subunits of voltage-gated sodium channels (65), and neuregulin-1 (50, 66). This finding could be interpreted in two ways, one being that IL-1R2 is not a physiological substrate for BACE1 and -2 and is only cleaved upon overexpression of both proteases. Although we cannot fully rule out this possibility, we consider it unlikely because of the points discussed below. First, we found that BACE1 and -2 do not simply cleave all membrane proteins tested. For example, TNF $\alpha$ , P-selectin, and CD14 (this study) do not undergo increased shedding upon transfection of BACE1 and -2. Likewise, we previously reported that both proteases did not increase shedding of L-selectin and TNF receptor 2 (32). Thus, BACE1 and -2 clearly are specific with regard to the proteins that are cleaved and secreted in response to expression of both proteases. Second, BACE1 is expressed in all tissues, which express IL-1R2. Therefore, IL-1R2 cleavage may also occur at endogenous expression levels of BACE1. Third, we found that BACE1 and -2 induced cleavage of IL-1R2 at a peptide bond very close (four amino acids difference) to the cleavage site of the  $\alpha$ -secretase-like metalloprotease. This situation is very similar to APP, where the BACE2 cleavage site is at a distance of three to four residues from the  $\alpha$ -secretase cleavage site, such that the APP CTFs generated by both proteases (C83 through  $\alpha$ -cleavage and C79 through BACE2 cleavage) are not distinguishable by gel electrophoresis (67, 68). As a consequence, the amount of C83/C79 CTFs in BACE2 knock-out

cells is not significantly different from wild-type cells (39), because C83 is still generated and presumably to an enhanced extent. Likewise, we expect that the potential decrease in IL-1R2 processing in BACE1- and BACE2-deficient cells would be compensated for by an increased metalloprotease cleavage, such that no net change in total IL-1R2 processing would be observed. If a similar situation of nearby cleavage sites by different proteases is found in other membrane proteins, it may be a particular challenge to unequivocally identify a given protein as a novel substrate for BACE proteases. In fact, a similar result was observed for the type I membrane protein TGF $\alpha$  and the GPI-anchored protein CD16. Similar to IL-1R2, processing of both proteins was strongly enhanced upon transfection of BACE1 and -2, but their processing was not significantly altered in BACE1-deficient or BACE1 and BACE2 double-deficient cells (not shown). Both TGF $\alpha$  and CD16 are subject to an  $\alpha$ -secretase-like cleavage in their membrane-proximal domain, which generates fragments of the same apparent molecular weight as the ones generated by transfected BACE1 and BACE2. Thus, like IL-1R2, both TGF $\alpha$  and CD16 may be cleaved by BACE1 and -2 at a site very close to or identical to the metalloprotease cleavage site. Potentially, BACE1 and BACE2 may have a more general role as alternative  $\alpha$ -secretase-like proteases and be involved in the shedding of additional type I, type II, and GPI-anchored membrane proteins known to undergo ectodomain shedding. This hypothesis may also provide a molecular explanation for the relatively mild phenotype observed in BACE1-deficient (61–63) and in BACE1 and BACE2 double-deficient mice (39). With regard to the large number of ADAM proteases, which have at least partially redundant functions (4), BACE1 and -2 seem to be expressed at low levels. If both proteases act as alternative  $\alpha$ -secretases, their loss of expression could be compensated for by the ADAM proteases and would not necessarily lead to a similarly strong phenotype as it is observed for some of the ADAM protease knock-out mice (69, 70).

Regardless of whether or not IL-1R2 is cleaved by the endogenous BACE1, our finding that increased BACE1 expression enhances IL-1R2 shedding may provide a molecular explanation for a neuropathological change observed in AD brain. BACE1 expression is up-regulated in AD patients (71, 72) and thus may potentially be the cause of the enhanced amount of soluble IL-1R2 found in AD patients (22, 23). The increase in IL-1R2 shedding has been suggested to be a reaction of the brain to increased IL-1 concentrations found in AD brain (22). Given that IL-1 has been linked in multiple ways to AD (18), the increase in soluble IL-1R2 may be a cellular response aimed at binding the excess IL-1 and preventing detrimental effects of too much IL-1 in the brain.

**Acknowledgments**—We thank Harald Steiner and Susanne Schöbel for helpful comments on the manuscript and Konrad Beyreuther, Brian Seed, Denisa Wagner, Felix Randow, Regina Fluhrer, and Paul Saftig for providing reagents.

## REFERENCES

1. Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., and Goldstein, J. L. (2000) *Cell* **100**, 391–398



2. Kopan, R., and Ilagan, M. X. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 499–504
3. Blobel, C. P. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 32–43
4. Huovila, A. P., Turner, A. J., Peltto-Huikko, M., Karkkainen, I., and Ortiz, R. M. (2005) *Trends Biochem. Sci.* **30**, 413–422
5. Weihofen, A., and Martoglio, B. (2003) *Trends Cell Biol.* **13**, 71–78
6. Blobel, C. P. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 606–612
7. Haass, C. (2004) *EMBO J.* **23**, 483–488
8. Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999) *Nature* **398**, 513–517
9. Shah, S., Lee, S. F., Tabuchi, K., Hao, Y. H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C. E., III, Sudhof, T., and Yu, G. (2005) *Cell* **122**, 435–447
10. Hebert, S. S., Serneels, L., Tolia, A., Craessaerts, K., Derks, C., Filippov, M. A., Muller, U., and De Strooper, B. (2006) *EMBO Rep.* **7**, 739–745
11. Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2003) *J. Neurosci. Res.* **74**, 342–352
12. Citron, M. (2004) *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 92–97
13. Selkoe, D. J., and Schenk, D. (2003) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 545–584
14. Yan, R., Munzner, J. B., Shuck, M. E., and Bienkowski, M. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34019–34027
15. French, R. A., VanHoy, R. W., Chizzonite, R., Zachary, J. F., Dantzer, R., Parnet, P., Bluthe, R. M., and Kelley, K. W. (1999) *J. Neuroimmunol.* **93**, 194–202
16. Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S., and Allavena, P. (2001) *Trends Immunol.* **22**, 328–336
17. Griffin, W. S., Nicoll, J. A., Grimaldi, L. M., Sheng, J. G., and Mrak, R. E. (2000) *Exp. Gerontol.* **35**, 481–487
18. Mrak, R. E., and Griffin, W. S. (2001) *Neurobiol. Aging* **22**, 903–908
19. Rogers, J. T., Leiter, L. M., McPhee, J., Cahill, C. M., Zhan, S. S., Potter, H., and Nilsson, L. N. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 6421–6431
20. Ma, G., Chen, S., Wang, X., Ba, M., Yang, H., and Lu, G. (2005) *J. Neurosci. Res.* **80**, 683–692
21. Vardy, E. R., Catto, A. J., and Hooper, N. M. (2005) *Trends Mol. Med.* **11**, 464–472
22. Lindberg, C., Chromek, M., Ahrengart, L., Brauner, A., Schultzberg, M., and Garlind, A. (2005) *Neurochem. Int.* **46**, 551–557
23. Garlind, A., Brauner, A., Hojeberg, B., Basun, H., and Schultzberg, M. (1999) *Brain Res.* **826**, 112–116
24. Cui, X., Rouhani, F. N., Hawari, F., and Levine, S. J. (2003) *J. Immunol.* **171**, 6814–6819
25. Orlando, S., Sironi, M., Bianchi, G., Drummond, A. H., Boraschi, D., Yabes, D., and Mantovani, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 31764–31769
26. Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J., and Black, R. A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 14608–14614
27. Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. L., Baumeister, R., Fichteler, K., and Haass, C. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 848–851
28. Walter, J., Grunberg, J., Capell, A., Pesold, B., Schindzielorz, A., Citron, M., Mendla, K., George-Hyslop, P. S., Multhaup, G., Selkoe, D. J., and Haass, C. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5349–5354
29. Capell, A., Saffrich, R., Olivo, J. C., Meyn, L., Walter, J., Grunberg, J., Mathews, P., Nixon, R., Dotti, C., and Haass, C. (1997) *J. Neurochem.* **69**, 2432–2440
30. Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., and Haass, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39062–39065
31. Prokop, S., Shirota, K., Edbauer, D., Haass, C., and Steiner, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 23255–23261
32. Lichtenthaler, S. F., Dominguez, D. I., Westmeyer, G. G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48713–48719
33. Randow, F., and Seed, B. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 891–896
34. Ory, D. S., Neugeboren, B. A., and Mulligan, R. C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 11400–11406
35. Neumann, S., Schobel, S., Jager, S., Trautwein, A., Haass, C., Pietrzik, C. U., and Lichtenthaler, S. F. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 7583–7594
36. Capell, A., Steiner, H., Romig, H., Keck, S., Baader, M., Grim, M. G., Baumeister, R., and Haass, C. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 205–211
37. Schobel, S., Neumann, S., Seed, B., and Lichtenthaler, S. F. (2006) *Int. J. Dev. Neurosci.* **24**, 141–148
38. De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998) *Nature* **391**, 387–390
39. Dominguez, D., Tournoy, J., Hartmann, D., Huth, T., Cryns, K., Deforce, S., Serneels, L., Camacho, I. E., Marjaux, E., Craessaerts, K., Roebroek, A. J., Schwake, M., D'Hooge, R., Bach, P., Kalinke, U., Moechars, D., Alzheimer, C., Reiss, K., Saftig, P., and De Strooper, B. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 30797–30806
40. De Strooper, B., Simons, M., Multhaup, G., Van Leuven, F., Beyreuther, K., and Dotti, C. G. (1995) *EMBO J.* **14**, 4932–4938
41. Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condon, M. M., Teplow, D. B., and Haass, C. (2001) *EMBO Rep.* **2**, 835–841
42. Neumann, D., Kollwe, C., Martin, M. U., and Boraschi, D. (2000) *J. Immunol.* **165**, 3350–3357
43. Dovey, H. F., John, V., Anderson, J. P., Chen, L. Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L. Y., Freedman, S. B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E. J., Hu, K. L., Johnson-Wood, K. L., Kennedy, S. L., Kholodenko, D., Knops, J. E., Latimer, L. H., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I. M., Motter, R. N., Mutter, L. C., Nietz, J., Quinn, K. P., Sacchi, K. L., Seubert, P. A., Shopp, G. M., Thorsett, E. D., Tung, J. S., Wu, J., Yang, S., Yin, C. T., Schenk, D. B., May, P. C., Altstiel, L. D., Bender, M. H., Boggs, L. N., Britton, T. C., Clemens, J. C., Czilli, D. L., Dieckman-McGinty, D. K., Droste, J. J., Fuson, K. S., Gitter, B. D., Hyslop, P. A., Johnstone, E. M., Li, W. Y., Little, S. P., Mabry, T. E., Miller, F. D., and Audia, J. E. (2001) *J. Neurochem.* **76**, 173–181
44. Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., Steiner, H., and Haass, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13389–13393
45. Lichtenthaler, S. F., Wang, R., Grimm, H., Uljon, S. N., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3053–3058
46. Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A., and Kopan, R. (1998) *Nature* **393**, 382–386
47. Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tani, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., and Haass, C. (2002) *EMBO J.* **21**, 5408–5416
48. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999) *Science* **286**, 735–741
49. Stachel, S. J., Coburn, C. A., Steele, T. G., Jones, K. G., Loutzenhiser, E. F., Grego, A. R., Rajapakse, H. A., Lai, M. T., Crouthamel, M. C., Xu, M., Tugusheva, K., Lineberger, J. E., Pietrak, B. L., Espeseth, A. S., Shi, X. P., Chen-Dodson, E., Holloway, M. K., Munshi, S., Simon, A. J., Kuo, L., and Vacca, J. P. (2004) *J. Med. Chem.* **47**, 6447–6450
50. Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006) *Science* **314**, 664–666
51. Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1456–1460
52. Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14634–14641
53. Hooper, N. M., Karran, E. H., and Turner, A. J. (1997) *Biochem. J.* **321**, 265–279
54. Hartwell, D. W., and Wagner, D. D. (1999) *Thromb. Haemostasis* **82**, 850–857
55. Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., and Scharpe, S. (1995) *FASEB J.* **9**, 736–744
56. Sisodia, S. S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6075–6079
57. Haass, C., Hung, A. Y., Selkoe, D. J., and Teplow, D. B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17741–17748
58. Gruninger-Leitch, F., Schlatter, D., Kung, E., Nelbock, P., and Dobeli, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 4687–4693
59. Turner, R. T., III, Koelsch, G., Hong, L., Castanheira, P., Ermoliev, J., Ghosh, A. K., Tang, J., Castanheira, P., and Ghosh, A. (2001) *Biochemistry* **40**, 10001–10006

60. Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Kotani, N., Ogawa, K., Suzuki, M., Dohmae, N., Takio, K., Saido, T. C., and Hashimoto, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 14865–14871
61. Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., and Wong, P. C. (2001) *Nat. Neurosci.* **4**, 233–234
62. Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M., and Vassar, R. (2001) *Nat. Neurosci.* **4**, 231–232
63. Roberds, S. L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M. J., Branstetter, D. G., Chen, K. S., Freedman, S. B., Frigon, N. L., Games, D., Hu, K., Johnson-Wood, K., Kappenman, K. E., Kawabe, T. T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N. F., Power, M., Robertson, D. W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G. M., Shuck, M. E., Sinha, S., Svensson, K. A., Tatsuno, G., Tintrup, H., Wijsman, J., Wright, S., and McConlogue, L. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1317–1324
64. Kitazume, S., Nakagawa, K., Oka, R., Tachida, Y., Ogawa, K., Luo, Y., Citron, M., Shitara, H., Taya, C., Yonekawa, H., Paulson, J. C., Miyoshi, E., Taniguchi, N., and Hashimoto, Y. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 8589–8595
65. Wong, H. K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P., and Nukina, N. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 23009–23017
66. Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D., and Yan, R. (2006) *Nat. Neurosci.* **9**, 1520–1525
67. Fluhner, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condrón, M. M., Teplow, D. B., Haass, C., and Walter, J. (2002) *J. Neurochem.* **81**, 1011–1020
68. Sun, X., Wang, Y., Qing, H., Christensen, M. A., Liu, Y., Zhou, W., Tong, Y., Xiao, C., Huang, Y., Zhang, S., Liu, X., and Song, W. (2005) *FASEB J.* **19**, 739–749
69. Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., and Saftig, P. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2615–2624
70. Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., and Black, R. A. (1998) *Science* **282**, 1281–1284
71. Fuller, S. J., Storey, E., Li, Q. X., Smith, A. I., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 8091–8098
72. Holsinger, R. M., McLean, C. A., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Evin, G. (2002) *Ann. Neurol.* **51**, 783–786